

## Tesis Doctoral

# Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino

Gervasi, María Gracia

2013-05-13

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Gervasi, María Gracia. (2013-05-13). Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

#### Cita tipo Chicago:

Gervasi, María Gracia. "Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-05-13.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**“Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del  
epitelio oviductal bovino”**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área  
de Ciencias Biológicas

**Lic. María Gracia Gervasi**

Directora de tesis: Dra. Silvina Laura Pérez Martínez

Consejero de estudios: Dr. Dante Paz

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biología de la reproducción en mamíferos. Centro de  
Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA).

Fecha: Buenos Aires, 2013.

**“Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del  
epitelio oviductal bovino”**

**“Participation of anandamide in the sperm release from the oviductal  
epithelia in bovines”**

**Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados en:**

“Anandamide induces sperm release from oviductal epithelia through nitric oxide pathway in bovines”.

Gervasi MG, Osycka-Salut C, Caballero J, Vazquez-Levin M, Pereyra E, Billi S, Franchi AM, Perez-Martinez S.

*PLoS One*. 2011 Feb 11; 6(2);e16993

“Anandamide levels fluctuate in the bovine oviduct during the oestrous cycle”.

Gervasi MG, Marczylo TH, Lam PMW, Rana S, Franchi AM, Konje JC, Perez-Martinez S.

(manuscrito en preparación)

“Sperm release from the oviductal epithelium depends on  $\text{Ca}^{2+}$  influx through TRPV1 and the sequential activation of CB1 and TRPV1 by AEA”

Gervasi MG, Osycka-Salut C, LLados C, Sanchez T, Franchi AM, Villalón M, Perez-Martinez S.

(manuscrito en preparación)

## **“Participación de la anandamida en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal en bovinos”**

El oviducto de los mamíferos actúa como un reservorio funcional de espermatozoides proveyendo un ambiente que permite su mantenimiento y competencia para la fecundación del oocito. La unión de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto (CEO) prolonga la vida del espermatozoide, retrasando la capacitación, hasta que señales asociadas a la ovulación inducen su liberación.

Varias moléculas del fluido oviductal participan en la regulación de la interacción espermatozoide-oviducto. La anandamida es un endocannabinóide que actúa a través de los receptores cannabinoides y ha sido detectada en el fluido oviductal.

Previamente demostramos que la anandamida induce la liberación de los espermatozoides de las CEO en bovinos. En este trabajo estudiamos la regulación y el mecanismo de acción de la anandamida en este proceso. Se caracterizó la principal vía metabólica de la anandamida durante el ciclo estral en el oviducto bovino, encontrándose que tanto las CEO como los espermatozoides expresan a las enzimas del metabolismo de la anandamida. Además la mayor concentración de anandamida en el fluido oviductal bovino fue detectada en el momento peri-ovulatorio, siendo el estradiol la hormona involucrada en la vía de activación de este endocannabinóide.

Asimismo la anandamida indujo la capacitación espermática y la liberación de los espermatozoides de las CEO a través de los receptores CB1 y TRPV1 con un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  espermático.

En conjunto, proponemos que en el momento peri-ovulatorio, las hormonas ováricas podrían inducir un incremento de anandamida oviductal favoreciendo la capacitación espermática con la consecuente liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal.

**Palabras clave:** espermatozoide – oviducto – selección oviductal – *endocannabinoides* – anandamida – hormonas ováricas – capacitación espermática –

## **“Participation of anandamide in the sperm release from the oviductal epithelia in bovines”**

Mammals' oviduct acts as a functional reservoir of spermatozoa, providing an environment that is proper for their maintenance and competence for the fecundation of the oocyte. The interaction of spermatozoa with oviductal epithelial cells (OEC) prolongs spermatozoa's life, delaying capacitation, until ovulation-related signals induce their release.

Several molecules from the oviductal fluid participate in the regulation of the sperm-oviduct interaction. Anandamide is an *endocannabinoid* that acts through *cannabinoid* receptors and it has been detected in oviductal fluid.

In previous work, we have demonstrated that anandamide induces spermatozoa release from OEC in bovines. In this work we studied the regulation and the mechanism of action of anandamide in this process. The main metabolic pathway of anandamide during estrous cycle in bovine oviduct was characterized. Both OEC and spermatozoa express enzymes from anandamide metabolism. Also, the highest anandamide concentration in oviductal fluid was found in peri-ovulatory stages, being estradiol the hormone involved in the activation pathway of this *endocannabinoid*.

Also, anandamide induced sperm capacitation and sperm release from the OECs through CB1 and TRPV1 receptors with an increase of intracellular calcium in spermatozoa.

From these results we propose that in peri-ovulatory stages, ovarian hormones could induce an increase in oviductal anandamide, promoting sperm capacitation of bound spermatozoa with subsequent release of spermatozoa from the OECs.

**Keywords:** spermatozoon – oviduct – oviductal selection – *endocannabinoids* – anandamide – ovarian hormones – sperm capacitation –

## **Agradecimientos**

A mis padres, Marta y Mateo. Por tanto esfuerzo, apoyo y dedicación durante todos estos años. Por haber estado a mi lado cada vez que fue necesario. Los quiero!

A mi hermana Verónica, por el apoyo diario, por interesarse y acompañarme. Por dejarme compartir tantos hermosos momentos con mis sobrinos, esos mellis divinos!!!! A Lou por tantos momentos divertidos e inolvidables vividos y a Román por enseñarme que un abrazo vale más que mil palabras.

A mi hermana Marina, por estar presente desde tan lejos. Por darme una sobrina tan hermosa! A Magalí por esa sonrisa mágica que me alegra la vida.

Al resto de mi familia: nonna, tíos, tías y primos. Por acompañarme en cada momento.

A Silvina, mi directora. Por tantos años compartidos, por haberme formado con tanta paciencia y dedicación. Por haber confiado en mi y haberme dado la libertad que me dio.

A Ana Franchi. Por ser una persona tan accesible y hacerme sentir parte de su grupo de trabajo.

A Juli, por ser tan especial para mi. Por haber estado ahí siempre para ayudarme, aconsejarme y apoyarme. Por tantos mates, charlas, risas, llantos, abrazos, afters, experimentos. Gracias Totó!

A Manu, por ser el mejor amigo que alguien puede tener en el mundo. Por la infinita predisposición y paciencia. Por tantas horas de bancarme, de escucharme y de aguantarme. Y obvio... por cocinar rico!

A Claudia (Klauchi), por hacer del trabajo algo llevadero y divertido. Por tanto aguante y horas compartidas en el 17 y afuera! Por tanto skype y tanta anécdota para contar.

A Juliana (Pichu), por esa conexión a tierra que me generás, por los chistes malos y todo el aguante de este último tiempo.

A Mariana y Lauchi, por estar siempre pendientes, tirar tanta buena onda y por toda la ayuda que siempre me dieron.

A Maki, por la buena onda y por ese ingenio para llegar a ser Maki-giver y solucionar problemas!

A Rami, por ayudar en todo lo posible y por recibirme siempre con unos ricos mates!

A Elba, por ayudarme con las inmunos y la congelada de células.

A Silvia, por todas la ayuda en mis comienzos y por estar siempre pendiente de mis pasos.

A Fer. Porque apareciste en el momento justo. Por ser mi menti. Y por ser tan obse y peleador!!!

A Turi. Por tanta alegría, tanta risa y patada compartida. Turi-Pu!

A Pauli, Vicki y Tronqui, por tanta charla y risas compartidas.

A Mica, Cyn y Jime, por los momentos compartidos y por el aguante del 113!

A Manuel Villalón, por haberme recibido con las puertas abiertas en su laboratorio.

A Carmen por ser casi como una mamá chilena para mí. Gracias por todo!!!

A Dani, por ser una persona tan especial. Por todas esas tardes divertidas en la Cato!

A Caty y Paty. Por hacer más amenos mis días en otro país, y por todo el carrete compartido también!

A Justin Konje por haberme recibido en su laboratorio con las puertas más que abiertas.

A Tim, por enseñarme tanto en tan poco tiempo.

A Katerina, por todas las charlas, risas y salidas compartidas.

A Caro, mi amiga del alma. Por tantos pero tantos momentos vividos. Por estar siempre ahí pase lo que pase. Por compartirme a Simón (Y a Simón por tantos miaus, mimos y horas de escritura de tesis compartidas). Infinitas gracias para vos!

A Die, porque esa nube pi nunca dejó de existir.

A Mica y Sara, por estar siempre a pesar de la distancia.

A Mari Z, Pau, Nico, Gastón, Axel y Martín. Por muchos años de juntadas, risas y aguante!!!!

A Eve, por tantas charlas y experiencias compartidas (uy!).

A Guly, porque los esquemitas quedaron divinos!

A Guada. Por esta amistad gigante y por el aguante de estos días.

A toda la unidad de reproducción de la Cato por hacerme sentir como en casa.

A toda la gente del CEFyBO, por haberme ayudado todos estos años.

A PLISSER, la fundación Boeringher y al MBL por haberme otorgado la posibilidad de realizar las pasantías y cursos en el exterior.



A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET por brindarme el lugar de trabajo y la fuente de financiación que me permitió realizar este trabajo.

Y a todos los que de algún modo estuvieron ahí. Gracias totales!!!!

## Abreviaturas

$\Delta^9$ -THC:	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
15-HAEA:	15-hidroxi-AEA
15-LOX:	15-lipooxigenasa
2-AG:	2-araquidonilglicerol
AA:	Ácido araquidónico
ABC:	Área bajo la curva
ABH4:	Complejo enzimático $\alpha/\beta$ -hidrolasa 4
ACEA:	Araquidonil-2'-cloroetilamida
ACs:	Adenilato ciclasa soluble
ADNc:	Ácido desoxiribonucleico copia
AEA:	N-araquidoniletanolamida
AEA-d8	N-araquidoniletanolamida deuterizada
AMPc:	Adenosin mono fosfato cíclico
Ant-CB1:	SR141716A (antagonista selectivo de CB1)
Ant-TRPV1:	Capsazepina (antagonista selectivo de TRPV1)
ANXA 1, 2, 4 y 5:	Anexinas
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
BAPTA2-AM	1,2-bis-(o-Aminofenoxi)-etano-N,N,N',N'-ácido tetraacético, tetraacetoximetilester.
BSA:	Albúmina sérica bovina
BSP1, 3 y 5:	Proteínas de unión de los espermatozoides bovinos
CatSper:	Canal de $\text{Ca}^{2+}$ del espermatozoide
CB1:	Receptores de <i>cannabinoides</i> tipo 1
CEO:	Células epiteliales del oviducto
COX-2:	Ciclooxigenasa-2
CTC:	Clorotetraciclina
DO:	Densidad óptica
E:	$17\beta$ -estradiol
ERK:	Quinasa regulada por quinasas extracelulares
ESP:	Espermatozoides

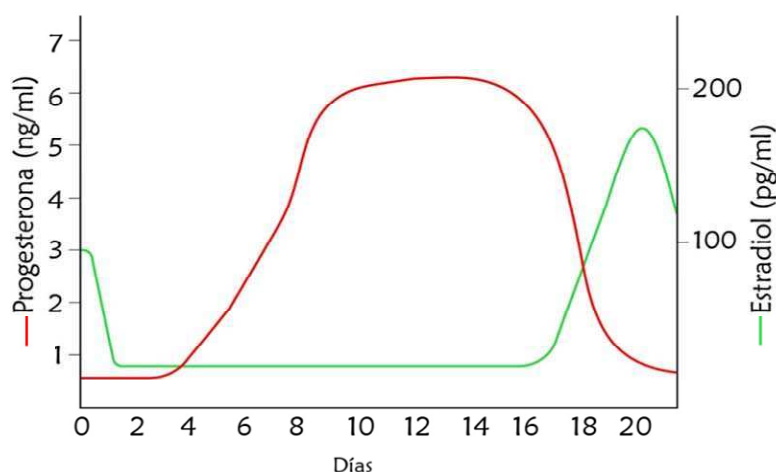
FAAH:	Hidrolasa de amidas de ácidos grasos
FSH:	Hormona folículo estimulante
FURA2-AM	Fura-2-Acetoximetilester
glicero-p-AEA:	glicero-fosfo-AEA
GPCR:	Receptores acoplados a proteína G
GSH:	Glutación reducido
GTP:	Guanidin tri fosfato
h:	Hora/s
HSP70:	<i>Heat shock protein 70</i>
IgA:	Inmunoglobulina A
IgG:	Inmunoglobulina G
Liso-NAPE:	N-araquidonil-liso-fosfatidiletanolamida
Liso-PLD:	liso-fosfolipasa D
L-NAME:	L-NG-Nitroarginina metil éster
LPC:	Lisofosfatidilcolina
MAPK:	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
Met-AEA:	R(+)-Metanandamida
min:	Minuto/s
MP:	Motilidad progresiva
NAAA:	N-acil-etanolamina-hidrolasa amidasa ácida
NADA:	N-araquidonildopamina
NAEs:	N-aciletanolamidas
NAPE:	N-Acil-fosfatidil-etanolamida
NAPE-PLD:	N-Acil-fosfatidil-etanolamida fosfolipasa D
NAT:	N-acil-transferasa
NBC:	Transportador de Na <sup>+</sup> y HCO <sup>3-</sup>
OEA:	Oleoiletanolamida
OEA-d2	Oleoiletanolamida deuterizada
P:	Progesterona
p-AEA:	fosfo-AEA
PBS:	Buffer fosfato salino
PDE:	Fosfodiesterasa
PEA:	Palmitoiletanolamida

PEA-d4	Palmitoiletanolamida deuterizada
PF:	Paraformaldehído
PGA2:	Prostaglandina A2
PGB1:	Prostaglandina B1
PGB2:	Prostaglandina B2
PGE2:	Prostaglandina E2
PGE <sub>2</sub> -EA:	Prostaglandina E <sub>2</sub> -etanolamida
PGES:	Prostaglandina E2 sintasa
PGFS:	Prostaglandina F2 $\alpha$ sintasa
PI3K	Fosfoinositol 3 quinasa
PIP <sub>2</sub> :	Fosfatidil-inositol bifosfato
PKA:	Proteína quinasa A
PKC:	Proteína quinasa C
PLC:	Fosfolipasa C
PLD:	Fosfolipasa D
PPAR $\alpha$ :	Receptores activados por peroxisomas $\alpha$
PSA-FITC	Agglutinina <i>Pisum sativum</i> conjugada con isotiocianato de fluoresceína
PVDF:	Polivinildenedifloride
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
seg:	Segundo/s
SFB:	Suero fetal bovino
sPLA2:	Fosfolipasa A <sub>2</sub> secretora
TA:	Temperatura ambiente
TLC:	Cromatografía de capa delgada
TRP	Receptores de potencial transiente
TRPV1:	Receptores de <i>vanilloides</i> tipo 1
UPLC-MS/MS:	Cromatografía líquida de alta definición acoplado a espectrometría de masa/masa
UV:	Ultravioleta
Virodamina:	O-araquidoniletanolamina

## 1. El ciclo estral bovino

Se denomina ciclo estral a las diferentes etapas que se suceden entre dos períodos de estro (o celo) que se manifiestan en las hembras a partir de la pubertad en forma regular en ciclos. Durante este período, la hembra se prepara generando condiciones fisiológicas favorables para que ocurra la fecundación, invasión y desarrollo del feto. En general representa un proceso complejo de modificaciones morfológicas y endócrinas del tracto reproductivo y el sistema nervioso central, y se encuentra regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario a través de las gonadotrofinas y las hormonas ováricas.

El ciclo estral en bovinos tiene una duración promedio de 21 días (Figura 1). El estro (considerado día 0) es el momento en el que la hembra exhibe un comportamiento receptivo frente al macho y el mismo dura entre 12 y 24 horas (Downey, 1980). La ovulación ocurre luego del estro y el cuerpo lúteo restante en el ovario comienza a producir progesterona (P). Por ello es que entre los días 3 y 4 del ciclo las concentraciones de P plasmática comienzan a incrementarse y se mantienen elevadas hasta que el cuerpo lúteo regresa (Downey, 1980). Durante esta fase luteal (desde el día 6 hasta el día 17) la P ejerce una retroalimentación negativa sobre el centro tónico del hipotálamo, reduciendo la frecuencia de pulsos de hormona liberadora de gonadotrofinas con la consecuente disminución de la frecuencia de secreción de hormona luteinizante por parte de la hipófisis, impidiendo de esta manera que ocurra la ovulación (Rahe y col., 1980).



**Figura 1.** Esquema representativo de los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona durante el ciclo estral bovino.

Una vez que ocurre la regresión del cuerpo lúteo, comienza la fase folicular. La misma dura desde el día 18 hasta el día 21 del ciclo. Durante este período, el folículo dominante secreta  $17\beta$ -estradiol (E) elevándose las concentraciones plasmáticas de este estrógeno hasta alcanzar una concentración máxima que es previa o coincidente con la ocurrencia del estro (Downey, 1980). En el período peri-ovulatorio, los niveles plasmáticos de P decaen y el E actúa sobre la hipófisis generando un pico de hormona luteinizante que desencadena la maduración final del folículo y la ovulación (Rahe y col., 1980).

Los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral bovino son críticos para determinar la dinámica de los eventos que suceden dentro del oviducto y regular la funcionalidad de este órgano.

## **2. El oviducto de mamíferos**

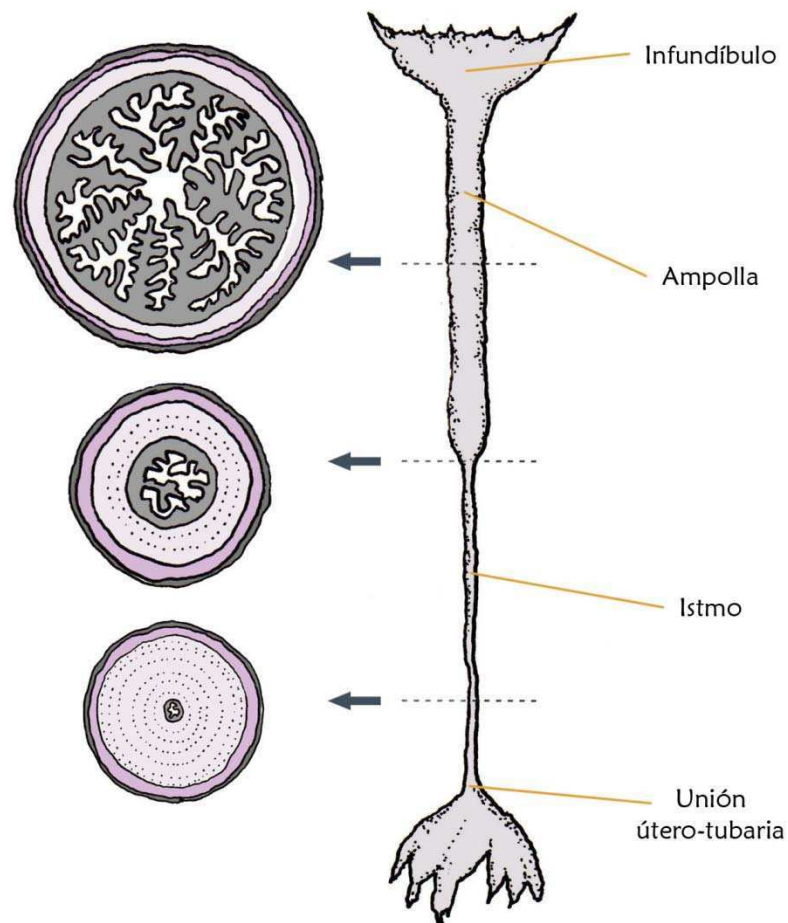
El oviducto de los mamíferos es un órgano complejo que forma parte de la anatomía del sistema reproductor de la hembra. Este órgano fue descrito hace más de 400 años por Gabriele Fallopio, profesor de la Universidad de Padua. En un principio se creía que este órgano era un simple conducto que transportaba a las gametas y a los embriones. Sin embargo, hoy en día se sabe que el oviducto cumple diversas funciones relacionadas a la reproducción siendo esencial para que ocurran la fecundación y el desarrollo y transporte embrionario (Holt y Fazeli, 2010; Mondejar y col., 2012).

### ***2.1. Anatomía del oviducto de mamíferos***

El oviducto de mamíferos es un órgano tubular que conecta al ovario con el útero. La pared oviductal está compuesta por tres capas: una serosa externa, una capa muscular intermedia y una capa epitelial interna denominada mucosa.

Desde el punto de vista anatómico, en el oviducto pueden distinguirse 4 regiones desde el ovario al útero: el infundíbulo, la ampolla, el istmo y la unión útero-tubaria (Figura 2). La complejidad de la pared oviductal varía entre estas regiones ya que difiere entre ellas el grosor de la musculatura lisa, la composición celular y el grado de plegamiento de la mucosa (Villalón y col., 2010).

La mucosa está formada por un epitelio cilíndrico monoestratificado sobre un estroma de tejido conjuntivo vascularizado (Villalón y col., 2010). La misma presenta una estructura compleja de pliegues primarios y secundarios con diferente espesor y orientación hacia el lumen del oviducto formando crestas y surcos que van incrementando su superficie desde el istmo hacia la ampolla (Hunter y col., 1991).



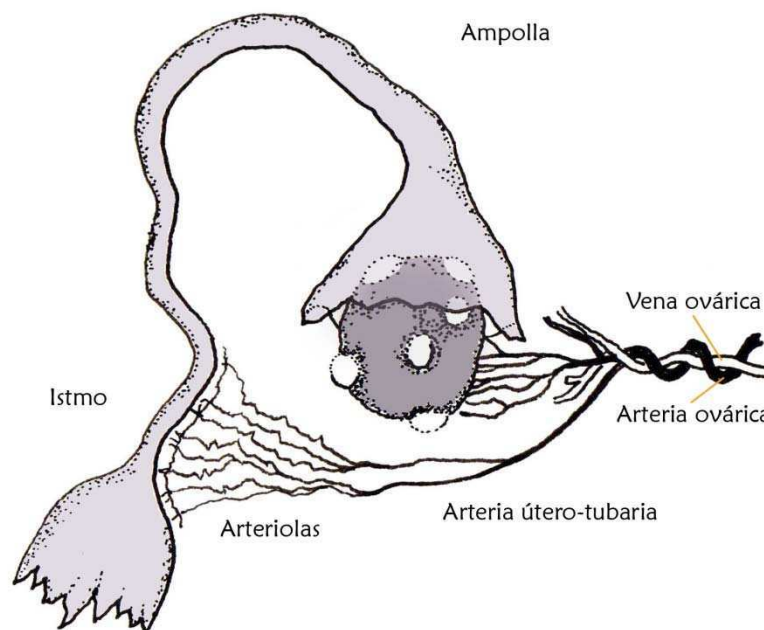
**Figura 2.** Representación esquemática del oviducto de mamíferos. Infundíbulo: región próxima al ovario; ampolla: posee una delgada capa muscular y una mucosa muy desarrollada; istmo: región con la musculatura circular engrosada y una mucosa simple, lugar donde se forma el reservorio oviductal; unión útero-tubaria: región estrecha que conecta al oviducto con el útero. Modificado de Hunter (2012).

El epitelio que forma parte de esta mucosa está compuesto principalmente por 2 tipos celulares: células ciliadas y células secretoras. La distribución y la morfología de ambos tipos celulares cambia según el momento del ciclo estral, la región del oviducto e incluso la región específica del pliegue de la mucosa (apical o basal) (Mondejar y col., 2012).

El infundíbulo es la región distal del oviducto que conecta el ovario con el oviducto. Posee una mucosa con alta densidad de células ciliadas y una delgada capa de fibras musculares. La ampolla se extiende desde la unión istmo-ampolla hasta el infundíbulo. Se caracteriza por poseer el mayor nivel de complejidad en la mucosa y una capa muscular delgada. El istmo

forma el tercio proximal del oviducto y se encuentra adyacente al útero. Esta porción del oviducto posee una mucosa simple, es decir con pocos pliegues y una capa muscular circular engrosada (Villalón y col., 2010). El oviducto finaliza en la región útero-tubaria que es un estrechamiento del tracto que une al cuerno uterino con el istmo oviductal (Hunter y col., 1991).

Si bien el oviducto se encuentra completamente innervado por fibras nerviosas autónomas simpáticas, la mayor innervación se encuentra en la capa de musculatura circular del istmo, siendo este un posible mecanismo de regulación de la permeabilidad del oviducto (Hunter, 2012).




---

**Figura 3.** Representación esquemática del sistema vascular relacionado al oviducto. Es posible el pasaje de componentes desde la vena ovárica hacia la arteria ovárica mediante un sistema de contra-corriente. Modificado de Hunter (2012).

---

Respecto a la irrigación sanguínea, el oviducto se encuentra asociado a un sistema vascular local constituido por la arteria ovárica de la cual se desprende la arteria útero-tubaria u oviductal (Figura 3). Esta a su vez se ramifica en numerosas arteriolas que forman una red vascular la cual irriga el istmo oviductal (Hunter, 2012). En este sentido cabe destacar que algunas moléculas producidas por el ovario que entran a la vena ovárica, pueden pasar por un sistema de contra-corriente a la arteria ovárica y de ahí viajar hasta la rama oviductal y



alcanzar el oviducto. Por ejemplo, las hormonas producidas en los folículos ováricos maduros llegan a las arteriolas del oviducto ipsilateral coordinando los cambios en el epitelio y la funcionalidad del mismo sincrónicamente con la maduración del folículo (Hunter, 2012).

## ***2.2. Fluido oviductal***

El fluido oviductal es complejo y está formado por diferentes componentes provenientes de las secreciones de las células epiteliales del oviducto y del plasma sanguíneo que ingresan por trasudación (Leese, 1988; Mondejar y col., 2012). Además, es posible que algunos componentes ingresen al oviducto junto con el fluido de la cavidad peritoneal o con el fluido folicular proveniente de la ruptura del folículo al momento de la ovulación (Hansen y col., 1991).

Varios componentes metabólicos forman parte de este fluido, entre ellos se encuentran: la glucosa, el lactato, el piruvato y algunos aminoácidos cuyas concentraciones difieren de las encontradas en el fluido uterino o en el plasma sanguíneo (Aviles y col., 2010). Además, diversas proteínas, enzimas, hidratos de carbono simples y complejos, iones, lípidos y fosfolípidos forman parte del fluido oviductal (Killian, 2011).

La composición del fluido oviductal se encuentra bien documentada en mamíferos (Miller y Schultz, 1987; Dickens y col., 1995; Boatman, 1997; Tay y col., 1997). Particularmente, los componentes del fluido oviductal bovino fueron determinados por el grupo de Grippo y col. (1992).

Las concentraciones de iones en este fluido varían en función de las regiones del oviducto y del ciclo estral. Por ejemplo, la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  difiere entre la ampolla y el istmo encontrándose la concentración máxima en el istmo durante el estro y el momento de la ovulación. Por otro lado, la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  varía a lo largo del ciclo estral pero no entre las distintas regiones del oviducto, y es menor que la concentración encontrada en el suero. Sin embargo, las concentraciones de  $\text{K}^{+}$  o de  $\text{Na}^{+}$  del fluido oviductal son similares entre las regiones o estadios pero la concentración de  $\text{K}^{+}$  del oviducto es mayor a la del plasma sanguíneo (Grippo y col., 1992).

La concentración de lípidos también ha sido determinada en el fluido oviductal bovino. Por ejemplo, la mayor concentración de colesterol ha sido detectada en el istmo oviductal durante la fase luteal del ciclo estral. Además, la concentración de los fosfolípidos esfingomielina y lisofosfatidilcolina también fluctúa durante el ciclo estral y entre las distintas regiones del oviducto bovino (Grippo y col., 1994).

Por otro lado, las concentraciones de glicosaminoglicanos sulfatados tales como condroitin sulfato y componentes similar heparina presentes en el fluido oviductal bovino varían durante el ciclo estral, encontrándose los mayores niveles de éstos en los estadios periovulatorios (Lee y Ax, 1984).

La mayor parte de las proteínas presentes en el fluido oviductal está constituida por la albúmina, la  $\beta$ -globulina y la  $\gamma$ -globulina entre otras (Mastroianni y col., 1970; Feigelson y Kay, 1972; Stanke y col., 1974; Ehrenwald y col., 1990). Sin embargo, varios grupos han demostrado que el oviducto de bovinos sintetiza una gran variedad de péptidos y proteínas, encontrándose entre ellas ciertas glicoproteínas oviducto-específicas, osteopontinas, integrinas, haptoglobinas, catalasa, glutatión peroxidasa, superoxidodismutasa, hialuron, péptido natriurético A, proteínas de la matriz extracelular, activador e inhibidor de plasminógeno, IgA, Fas ligando y proteína chaperona 8 (Killian, 2011).

El complejo balance de los componentes presentes en el oviducto contribuye a un adecuado desarrollo de los diferentes procesos que ocurren en este órgano, entre ellos la regulación de la función espermática (Aviles y col., 2010; Killian, 2011).

### ***2.3. Función oviductal***

En los últimos años el concepto del oviducto como una estructura pasiva cuya única función es el transporte de las gametas fue sustituido por la visión de este órgano como una estructura dinámica que participa activamente en diversas funciones asociadas a la reproducción (Mondejar y col., 2012).

Si bien las diferentes regiones del oviducto están involucradas en el transporte oviductal de las gametas y embriones, cada una de ellas cumple además una función fisiológica particular. El batido ciliar sincrónico de los cilios presentes en el infundíbulo, ayudan a que éste capte e ingrese al oviducto a los complejos cúmulo-oocito que son ovulados hacia la cavidad peritoneal (Hunter, 2012). Una vez en el oviducto, los complejos cúmulo-oocito viajan hacia la ampolla, que es el sitio donde se encuentran las gametas y ocurre la fecundación (Villalón y col., 2010). El istmo es la región del oviducto donde se forma el reservorio funcional de espermatozoides mediante la unión de los espermatozoides que ingresan al oviducto con las células epiteliales del istmo hasta el momento de la ovulación (Suarez, 2008; Hunter, 2012). Además, se propone que esta unión de los espermatozoides al epitelio oviductal junto con el microambiente del istmo modulan la funcionalidad espermática promoviendo la capacitación de los mismos (Mondejar y col., 2012). Por otro lado, la unión útero-tubaria conecta al útero con el oviducto, este segmento funciona como barrera selectiva de espermatozoides debido a

su lumen estrecho y a que solo pueden atravesarla aquellos espermatozoides que expresen ciertas proteínas en la membrana plasmática de su cabeza (Suarez, 2008).

### **3. El espermatozoide de mamíferos**

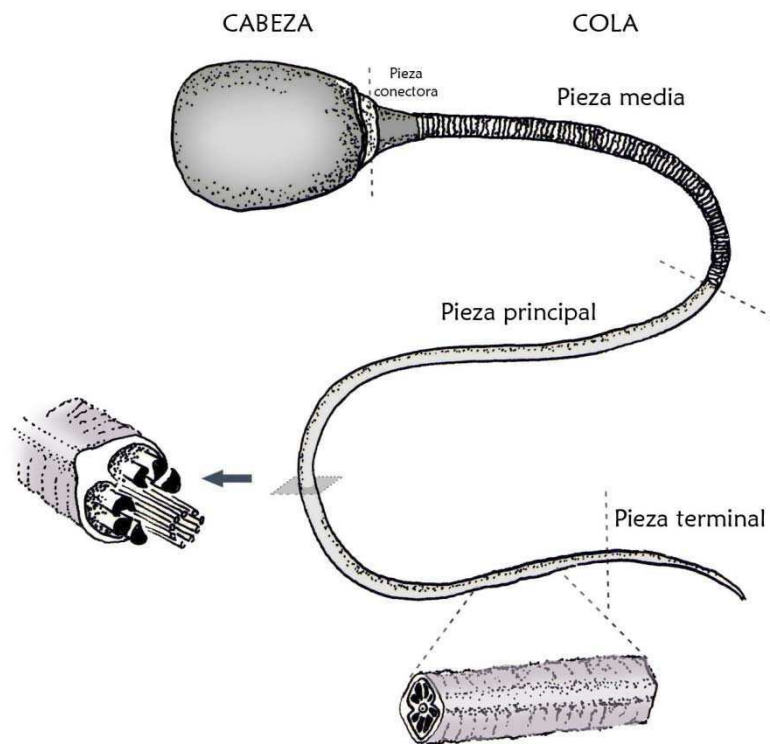
El espermatozoide es una célula altamente especializada con características particulares tanto a nivel estructural como funcional que le confieren la capacidad de transferir la carga genética del macho al huevo o cigoto (Eddy, 2006). Estas células fueron descubiertas en el año 1676 por el microscopista Anton van Leeuwenhoek y el estudiante de medicina Johan Ham quienes observaron pequeñas criaturas parecidas a renacuajos en el plasma seminal de humanos, perros, conejos y peces. Sin embargo, los espermatozoides fueron reconocidos como células por Albert von Koelliker recién en el año 1840. Posteriormente (entre 1875-1879), van Beneden, Hertwig y Fol describieron en forma independiente que la fecundación ocurre debido a que el espermatozoide ingresa al oocito y se unen los núcleos de estas dos células (Yanagimachi, 2012).

#### ***3.1. Morfología y función espermática***

Los espermatozoides son el producto final de la espermatogénesis. Éste es un complejo proceso que ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos y puede dividirse en 3 etapas: una etapa en la que las espermatogonias (precursores espermáticos diploides) se dividen activamente por mitosis y generan espermatocitos (diploides); una etapa en la que se generan las espermatidas haploides mediante meiosis; y una etapa final denominada espermiogénesis en la cual las espermatidas sufren cambios drásticos en su forma y estructura para convertirse en espermatozoides y luego ser liberados al lumen de los túbulos seminíferos.

Los espermatozoides poseen características celulares únicas relacionadas a su función. Morfológicamente están compuestos por una cabeza y una cola unidas por la pieza conectora (Figura 4) (Eddy, 2006).

En la cabeza se encuentran el núcleo, el acrosoma, algunas estructuras del citoesqueleto y una pequeña porción de citoplasma. El núcleo es particular ya que contiene la información genética en forma de cromatina altamente condensada, ocupando un volumen mínimo. El acrosoma es una vesícula membranosa ubicada en la región anterior de la cabeza que contiene numerosas enzimas hidrolíticas. Esta estructura le permite al espermatozoide penetrar al oocito y conseguir una fecundación exitosa (Eddy, 2006).



**Figura 4.** Representación esquemática del espermatozoide de bovinos. La pieza conectora une a la cabeza del espermatozoide con la cola. Las regiones del flagelo son la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal. La pieza media contiene la vaina mitocondrial mientras que la pieza principal contiene al axonema rodeado por las fibras densas. En el esquema se muestra un corte transversal y un corte longitudinal de la pieza principal. Modificado de Eddy (2006).

Por otro lado, la cola puede dividirse en 3 regiones: la pieza media, la pieza principal y la pieza terminal (Figura 4). Desde el cuello hasta la pieza principal de la cola se extiende el axonema que es un complejo de microtúbulos que se encuentra rodeado por las fibras densas externas. La pieza media contiene una vaina de mitocondrias plegadas en forma de hélice que rodean a las fibras densas externas y al axonema. La pieza principal contiene una lámina fibrosa rodeando al axonema y las fibras densas externas.

En conjunto, estas estructuras altamente especializadas le confieren al espermatozoide las funciones únicas de este tipo celular. La cabeza contiene la información genética que se fusionará con la del oocito; en el acrosoma se encuentran las enzimas esenciales que le

permiten penetrar al oocito y conseguir la fecundación; mientras que en la cola se encuentra la principal fuente de energía ya que contiene la maquinaria necesaria para generar la motilidad del espermatozoide facilitando de esta manera el encuentro con el oocito (Eddy, 2006).

### ***3.2. Adquisición de la capacidad fecundante***

Cuando los espermatozoides abandonan los túbulos seminíferos del testículo, si bien constituyen células altamente diferenciadas, son no mótils, inmaduros y no tienen capacidad de fecundar al oocito. La capacidad fecundante la adquieren durante su tránsito por el tracto reproductor del macho, en un proceso conocido como maduración espermática, y por el de la hembra, en un proceso conocido como capacitación.

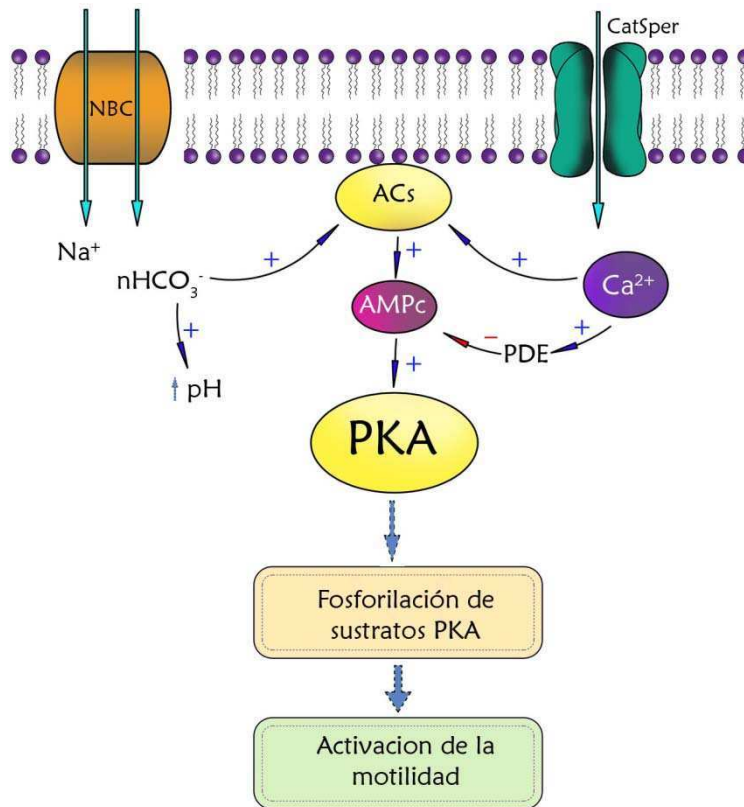
La maduración espermática ocurre en el epidídimo del macho e implica una serie de cambios estructurales en la membrana plasmática del espermatozoide. Durante este proceso los espermatozoides adquieren, entre otras cosas, la motilidad progresiva necesaria para la fecundación (Eddy, 2006).

Sin embargo, los espermatozoides que experimentaron la maduración epididimaria si bien son capaces de moverse activamente aún no poseen la capacidad de fecundar a un oocito.

Esto se debe a que los mismos deben atravesar un proceso de maduración adicional dentro del tracto reproductor de la hembra denominado capacitación espermática (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952).

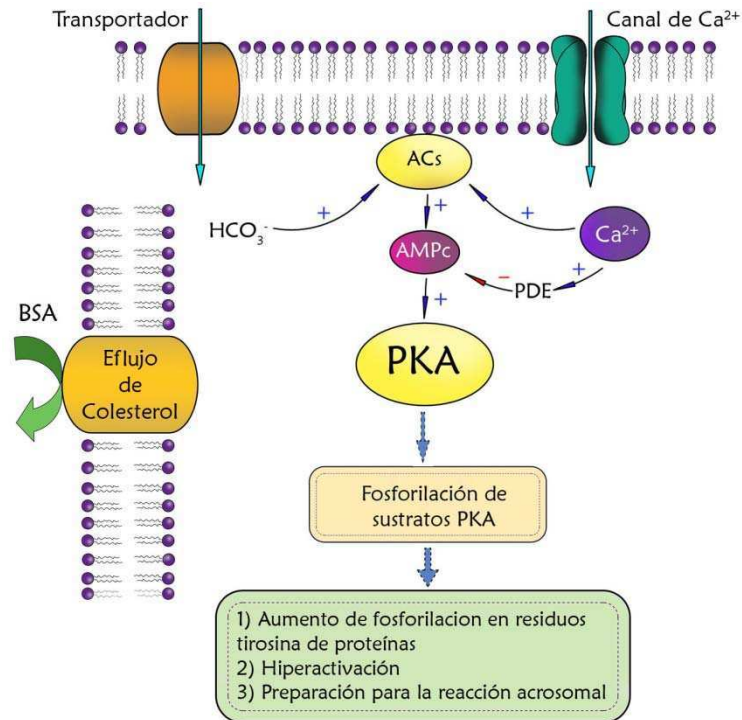
### ***3.3. La capacitación espermática***

La capacitación espermática fue descrita, por primera vez en el año 1951, por los investigadores Chang y Austin, quienes descubrieron en forma independiente que los espermatozoides de mamíferos requerían transitar por el tracto reproductor de la hembra para adquirir la capacidad fecundante. Este proceso al que denominaron “período de capacitación”, comienza en el momento en que los espermatozoides son depositados en el tracto reproductor de la hembra y finaliza dentro del oviducto (Austin, 1951; Chang, 1951; Austin, 1952).



**Figura 5.** Bases moleculares de los eventos tempranos que ocurren durante la capacitación espermática de mamíferos. NBC: transportador de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ ; ACs: adenilato ciclasa soluble; CatSper: canal de  $\text{Ca}^{2+}$  del espermatozoide; PKA: proteína quinasa A; PDE: fosfodiesterasa. La activación de estas vías moleculares desencadena la fosforilación de sustratos PKA que activan la motilidad del espermatozoide. Modificado de Visconti (2009).

En la actualidad, la capacitación se define como el conjunto de cambios fisiológicos y estructurales del espermatozoide que ocurren dentro del tracto reproductor femenino que le permiten al mismo llevar a cabo la reacción acrosomal en respuesta a señales estimuladoras del oocito (Florman, 2006). Este proceso involucra diversos fenómenos que están finamente regulados e interconectados, dándose en forma secuencial o paralela en el tiempo (Vadnais y col., 2007; Visconti, 2009). Estos cambios pueden diferenciarse entre eventos tempranos y tardíos e incluyen alteraciones en las propiedades de superficie como ser la composición y localización de las proteínas asociadas a la membrana y la carga de la superficie; cambios en ciertas propiedades de la membrana plasmática como ser el potencial de membrana, y la composición y asimetría lipídica de los fosfolípidos de la misma; cambios en el metabolismo y en la fosforilación de proteínas (Florman, 2006).



**Figura 6.** Bases moleculares de los eventos tardíos que ocurren durante la capacitación espermática de mamíferos. ACs: adenilato ciclasa soluble; PKA: proteína quinasa A; PDE: fosfodiesterasa; BSA: albúmina sérica bovina. La activación de estas vías moleculares desencadena un eflujo de colesterol de la membrana de los espermatozoides y la fosforilación de sustratos PKA que inducen un aumento en la fosforilación de residuos tirosina de las proteínas, un patrón de motilidad hiperactivado y en última instancia la preparación para la reacción acrosomal. Modificado de Visconti (2009).

Entre los eventos tempranos se encuentra la activación de canales iónicos (Florman y col., 1998) que facilitan, entre otros, el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  (Visconti y col., 1995a) y de  $\text{HCO}_3^-$  al espermatozoide. Este ingreso de  $\text{HCO}_3^-$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  genera un incremento del pH intracelular (Parrish y col., 1989). Se postula que en paralelo a este proceso, el  $\text{HCO}_3^-$  activa a una adenilato ciclasa soluble presente en el espermatozoide, incrementando los niveles de AMPc, y estimulando de esta manera a una proteína quinasa A (PKA) que fosforila a proteínas sustrato de PKA específicas. Esta compleja red de eventos que ocurren tempranamente durante la capacitación desencadenan en conjunto la activación de la motilidad del espermatozoide (Figura 5) (Visconti, 2009).

Entre los eventos tardíos se encuentra la remoción de colesterol de la membrana plasmática del espermatozoide (Harrison y col., 1996; Cross, 1998), esto genera una



reestructuración de la membrana plasmática con la consecuente remoción, redistribución y/o aparición de proteínas en la superficie espermática (Jaiswall y Eisenbach, 2002). Además, ocurre un incremento en proteínas fosforiladas en residuos tirosina (Visconti y col., 1995a; Visconti y col., 1995b), y la adquisición de un patrón de motilidad particular denominado hiperactivación (Yanagimachi, 1994). La hiperactivación se caracteriza por ser un movimiento de alta amplitud de la cola asociado a un batido asimétrico de la misma. Recientemente se ha descrito que las vías moleculares que desencadenan estos procesos también son dependientes de la activación de la adenilato ciclasa soluble y de la vía de AMPc y PKA (Figura 6) (Visconti, 2009).

La población de espermatozoides presentes en un eyaculado es funcionalmente heterogénea. Por lo tanto, estas células no se capacitan de manera sincronizada (Florman, 2006). Esto podría ser parte de un proceso regulatorio que mantenga un reducido número de espermatozoides capacitados en continua renovación (Cohen-Dayag y col., 1995).

Es posible inducir la capacitación espermática *in vitro* incubando los espermatozoides en un medio definido en ausencia del fluido seminal. La remoción de este fluido es esencial ya que la presencia del mismo inhibe la capacitación por contener factores decapacitantes que se adhieren a la membrana del espermatozoide (Yanagimachi, 1994). Existen medios definidos que se utilizan para capacitar *in vitro*. Si bien los mismos varían entre las distintas especies, contienen algunos elementos en común tales como: iones ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{HCO}_3^-$ ), sustratos de energía (piruvato o lactato) y albúmina (Yanagimachi, 1994). Además, en algunas especies es necesario incluir un agente inductor de la capacitación en el medio, por ejemplo: taurina o hipotaurina para espermatozoides de hámster (Lui y Meizel, 1979) y heparina para espermatozoides bovinos (Parrish y col., 1988).

### ***3.4. Pasaje por el tracto reproductor de la hembra.***

El pasaje de los espermatozoides a través del tracto reproductor de la hembra es un proceso altamente regulado, que favorece el tránsito de los espermatozoides móviles con morfología normal aumentando las probabilidades de que ocurra la fecundación (Suarez y Pacey, 2006).

Los mamíferos euterianos evolucionaron como organismos con fecundación interna. Esto se refiere a que durante la cópula el macho deposita el semen conteniendo los espermatozoides dentro del tracto reproductor de la hembra. En algunos grupos como los primates y bovinos el semen es depositado en la región de la vagina más cercana al cérvix



(Figura 7, panel A); mientras que en otros como porcinos y equinos el semen es depositado directamente en el útero (Suarez y Pacey, 2006).

La vagina es un segmento del tracto genital femenino en el cual se desarrolla un ambiente con diferentes estrategias antimicrobianas, entre ellas el pH ácido del fluido vaginal y una rápida respuesta inmune. Estas características generan un micro-ambiente hostil para los espermatozoides que son depositados en la misma, lo que llevó a la aparición de mecanismos adaptativos de protección de los espermatozoides. Por ejemplo, el pH del plasma seminal (entre 6,7 y 7,4) neutraliza la acidez del fluido vaginal y además este fluido contiene inhibidores de la respuesta inmune como algunos componentes protectores que recubren al espermatozoide (Suarez y Pacey, 2006).

En minutos, los espermatozoides que logran superar el ambiente hostil de la vagina, atraviesan el cérvix inmersos en el mucus cervical. Durante el estro, el mucus cervical de la hembra es abundante y altamente hidratado, actuando de esta manera como una barrera física que impide el paso de espermatozoides que no poseen morfología normal y/o motilidad adecuada. Mullins y col. (1989) demostraron la presencia de pliegues de la mucosa en el cérvix de bovinos, que forman canales orientados hacia la cavidad uterina (Mullins y Saacke, 1989). Además, el mucus de los canales es menos denso que el de la porción central del cérvix, lo que favorecería que los espermatozoides móviles y con morfología normal se desplacen hasta el útero por estos canales impidiendo ser alcanzados por componentes del sistema inmune de la hembra (Suarez y Pacey, 2006).

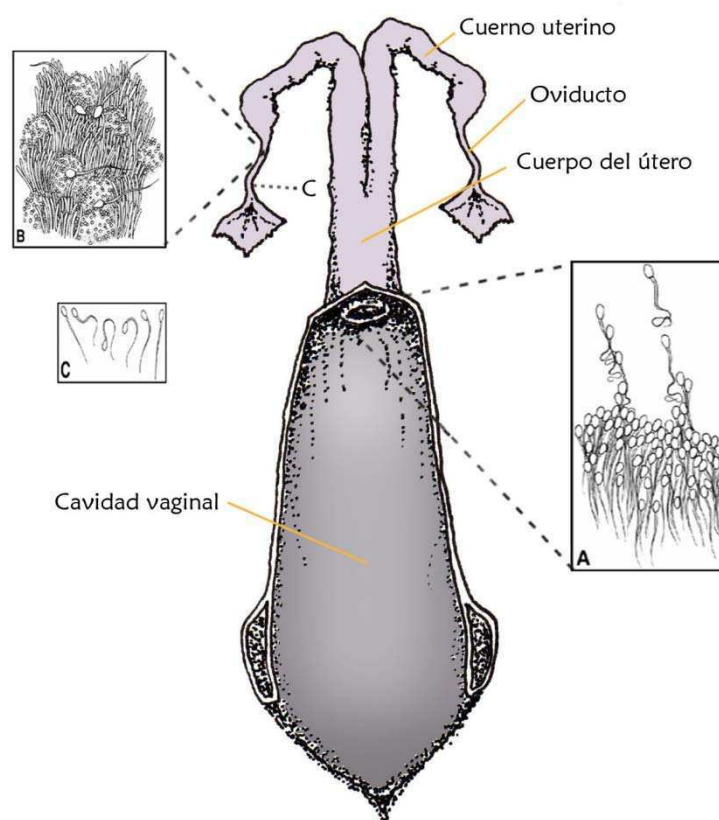
Una vez en el útero, las contracciones del miometrio favorecen el avance de los espermatozoides hacia el oviducto. Se ha demostrado que estas contracciones pueden ser estimuladas por componentes del plasma seminal (Crane y Martin, 1991).

La cavidad uterina en bovinos es extensa, siendo el cuerpo uterino de unos 2,5 a 4 cm de largo y los cuernos uterinos de entre 20 y 40 cm (Figura 7) (Roberts, 1986). Los espermatozoides deben atravesar rápidamente esta cavidad a fin de evitar ser fagocitados por los leucocitos infiltrantes presentes en el útero donde se ha observado principalmente fagocitosis de espermatozoides dañados (Suarez y Pacey, 2006).

Finalmente, para llegar al oviducto los espermatozoides deben atravesar la unión útero-tubaria. Esta región representa una barrera anatómica y fisiológica para el pasaje de los espermatozoides (Suarez y Pacey, 2006). En bovinos, esta región posee forma sigmoidea con una gruesa capa muscular y se encuentra sostenida por ligamentos musculares que comprimen el lumen y favorecen la formación de la curvatura (Hook y Hafez, 1968). Estas características, sumado a los pliegues mucosos hacia el útero (Yaniz y col., 2000), dificultan el pasaje de los espermatozoides limitando su llegada al oviducto. Estudios realizados en los últimos años

demostraron que no es suficiente que los espermatozoides posean morfología normal y motilidad progresiva para atravesar la unión útero-tubaria; se necesitan factores adicionales tales como proteínas presentes en la superficie espermática para lograr alcanzar el oviducto (Suarez y Pacey, 2006).

Una vez que llegan al oviducto, los espermatozoides se unen a las células epiteliales del mismo y se forma el reservorio oviductal hasta que señales asociadas a la ovulación inducen la liberación de los mismos permitiendo la llegada a la ampolla oviductal, sitio donde ocurre la fecundación (Figura 7, paneles B y C) (Suarez y Pacey, 2006).



**Figura 7.** Tránsito de los espermatozoides por el tracto reproductor femenino en bovinos. Durante la cópula los espermatozoides son depositados en el fondo de la vagina, una vez allí atraviesan el cérvix hacia el útero (detalle panel A). Luego ascienden por el cuerpo y los cuernos uterinos hasta llegar al istmo oviductal donde se unen a las células epiteliales del mismo y forman el reservorio oviductal (detalle panel B). Frente a señales asociadas a la ovulación, los espermatozoides se liberan del istmo y se desplazan hacia la ampolla que es el sitio donde ocurre el encuentro con el oocito (detalle panel C). Modificado de Suarez (2008).

#### 4. El reservorio oviductal

Estudios filogenéticos revelan que una estrategia reproductiva que parece haber surgido repetidamente a lo largo de la evolución es el almacenamiento de los espermatozoides en el tracto reproductor femenino. Esta característica evolucionó en forma independiente en insectos, peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Holt y Lloyd, 2010; Holt, 2011). Se cree que el valor adaptativo de la formación de un reservorio espermático radica en solucionar el problema de la asincronía que existe entre el momento de la cópula y la ovulación, que puede ocurrir en un rango de horas (en la mayoría de los mamíferos) hasta días, meses e incluso años en algunos reptiles (Holt y Lloyd, 2010).

Particularmente en mamíferos, el istmo oviductal es considerado un reservorio funcional de espermatozoides viables (Hunter, 2008). Esta estructura transitoria fue descrita por primera vez en hámsteres por los investigadores Chang y Yanagimachi en el año 1963. Ellos demostraron que, previo a la fecundación, los espermatozoides de hámster eran almacenados temporalmente en el istmo siendo menor el tiempo de almacenamiento cuando los animales eran apareados post-ovulación (Yanagimachi, 2009). Años más tarde, la existencia de este reservorio fue demostrada en diferentes mamíferos, entre ellos: conejos (Harper, 1973), porcinos (Hunter, 1981), ovinos (Hunter y Nichol, 1983) y bovinos (Hunter y Wilmut, 1984).

La unión de los espermatozoides al epitelio oviductal mantiene la fertilidad de los mismos durante su almacenamiento en el reservorio (Pollard y col., 1991; Ellington y col., 1993). Varios autores demostraron que la incubación de los espermatozoides con vesículas formadas por membrana del epitelio del istmo prolonga la viabilidad y motilidad de los mismos (humanos: Murray y Smith, 1997; bovinos: Murray y Smith, 1997; Gwathmey y col., 2006; porcinos: Fazeli y col., 2003; ovinos: Lloyd y col., 2009), mantiene bajos los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (equinos: Dobrinski y col., 1996b) y retrasa la capacitación espermática (humanos: Murray y Smith, 1997). Más aun, la incubación de espermatozoides con cultivos primarios de células epiteliales del oviducto mantiene la viabilidad de los mismos al menos por 48 h de cultivo (ovinos: Lloyd y col., 2008; cerdos: Yeste y col., 2009). Si bien se demostró que la incubación de los espermatozoides con medio condicionado obtenido a partir de cultivos primarios de células epiteliales del oviducto mejora la sobrevivencia de los mismos, el máximo efecto se observó cuando los espermatozoides estaban en contacto directo con las células del oviducto indicando que esta interacción celular es beneficiosa para las gametas (Yeste y col., 2009).

Se cree que la adhesión al oviducto es un mecanismo clave en la selección de subpoblaciones de espermatozoides de alta calidad, facilitando la llegada de éstos al encuentro con el oocito (Holt y Fazeli, 2010). Los espermatozoides que se unen al epitelio oviductal se

caracterizan por presentar acrosoma intacto (bovinos: Gualtieri y Talevi, 2000), estado no capacitado (bovinos: Lefebvre y Suarez, 1996; porcinos: Fazeli y col., 1999; equinos: Thomas y col., 1994), bajo contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular libre y bajos niveles de proteínas fosforiladas en residuos tirosina (porcinos: Petrunkina y col., 2001), morfología normal (equinos: Thomas y col., 1994) y estructura normal de la cromatina (porcinos: Ardon y col., 2008; humanos: Ellington y col., 1998).

Al llegar al reservorio, los espermatozoides son mantenidos allí hasta el momento de la ovulación en el que un pequeño número es liberado permitiendo el encuentro de los mismos con el oocito (Suarez, 2008). El proceso de liberación es gradual, en el que distintas subpoblaciones de espermatozoides van siendo liberadas en el tiempo reduciendo las posibilidades de polispermia (Suarez, 2008).

En conjunto, la formación del reservorio oviductal además de reducir la incidencia de polispermia, es importante para preservar la fertilidad de los espermatozoides mientras se encuentran almacenados (Suarez, 2008).

#### ***4.1. Moléculas que intervienen en la formación del reservorio oviductal***

La formación del reservorio ocurre mediante la unión de los espermatozoides a las células ciliadas del epitelio oviductal. En todas las especies estudiadas hasta el momento, el proceso de unión de los espermatozoides a las células epiteliales está mediado por residuos de glúcidos presentes en las células epiteliales y proteínas de la familia de las lectinas presentes en la cabeza de los espermatozoides (Suarez, 2002). Las moléculas involucradas en esta unión son específicas de cada especie (Coy y col., 2012). En la Tabla 1 se enumeran los oligosacáridos presentes en el epitelio oviductal que participan en esta unión para las distintas especies estudiadas.

<b>Especie</b>	<b>Oligosacáridos presentes en el epitelio oviductal</b>	<b>Cita</b>
<b>Hámster</b>	Ácido siálico	DeMott y col., 1995
<b>Equinos</b>	Galactosa	Dobrinski y col., 1996a
<b>Porcinos</b>	Galactosa y Manosa	Ekhlesi-Hundrieser y col., 2005
<b>Bovinos</b>	Fucosa	Suarez y col., 1998
<b>Camélidos sudamericanos</b>	Galactosa y N-acetilgalactosamina	Apichela y col., 2010

**Tabla 1.** Oligosacáridos que participan de la unión espermatozoide-oviducto en distintas especies.

Como fue mencionado previamente, del lado del espermatozoide intervienen en esta unión diversas proteínas del tipo lectina que poseen la capacidad de unirse a residuos glucosídicos (Coy y col., 2012). En bovinos, las proteínas BSP (por su denominación en inglés: Binder of SPerm) producidas por la vesícula seminal se anclan a la membrana plasmática de la cabeza de los espermatozoides cuando éstos entran en contacto con el plasma seminal y, una vez que llegan al oviducto, participan en la unión de éstos con el epitelio oviductal (Gwathmey y col., 2003).

Hasta el momento se han identificado 3 tipos de BSP en bovinos: BSP1 (previamente se la conocía como PDC-109), BSP3 y BSP5. Estas son moléculas de bajo peso molecular que poseen un dominio que une heparina, y difieren entre sí en la distribución de carga electrostática, propiedad que les confiere distinta afinidad por los residuos glicosilados del oviducto (Suarez, 2008). Si bien los 3 tipos de BSP se localizan en el acrosoma de los espermatozoides, cada una de ellas por separado puede promover la unión de los mismos al oviducto (Gwathmey y col., 2006).

Recientemente fueron identificadas 4 proteínas pertenecientes a la familia de las anexinas (ANXA 1, 2, 4 y 5) presentes en el epitelio oviductal bovino que actúan como moléculas receptoras de las BSP (Ignotz y col., 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares de interacción de las BSP con las ANXA aún se desconocen, y la identificación de múltiples BSP y posibles receptores (ANXA) indican la complejidad de la interacción entre la superficie del espermatozoide y la del epitelio oviductal (Hung y Suarez, 2012).

#### ***4.2. Interacción espermatozoide-oviducto***

La interacción de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto es altamente específica (Aldarmahi y col., 2012). Como se ha mencionado previamente, ocurre entre la membrana plasmática del espermatozoide en la región del acrosoma y las células ciliadas del epitelio oviductal (Suarez y col., 1991). Durante esta interacción se establece un diálogo entre los distintos tipos celulares que implica complejas vías de señalización moleculares que desencadenan cambios fisiológicos y funcionales tanto en los espermatozoides como en el oviducto (Holt y Fazeli, 2010).

#### ***4.3. Influencia de los espermatozoides sobre el oviducto***

Cerca del momento de la ovulación, la mucosa oviductal es sensible a señales locales desencadenadas por diversos factores como la interacción con las gametas, la entrada de los componentes presentes en el fluido folicular, y de la influencia de los cigotos y embriones

(Hunter, 2012). En los últimos años, varias investigaciones remarcaron que la interacción entre los espermatozoides y el oviducto resulta en una alteración de la expresión génica, proteica y de secreciones oviductales tanto *in vivo* como *in vitro* (Aldarmahi y col., 2012).

La presencia de espermatozoides en el oviducto equino puede modificar el perfil proteico de secreción de las células epiteliales del mismo (Ellington y col., 1993). Estos investigadores reportaron síntesis *de novo* de proteínas en cultivos primarios de células epiteliales del oviducto en co-cultivo con espermatozoides, sin embargo no pudieron establecer cuáles eran las proteínas que se veían modificadas. Estudios *in vivo* realizados en ratón demostraron que la llegada de los espermatozoides al oviducto luego de la cópula natural resulta en un aumento en la expresión de 214 genes en el oviducto (Fazeli y col., 2004). Además, el perfil proteico de secreción del oviducto porcino cambia de manera diferencial si el mismo está en contacto con espermatozoides o con oocitos (Georgiou y col., 2005). Estos investigadores identificaron 19 proteínas que son reguladas únicamente por los espermatozoides y 4 que son reguladas únicamente por los oocitos. Estas proteínas fueron clasificadas en 4 categorías de acuerdo a sus funciones en general: 1) producción proteica, mantenimiento y reparación; 2) antioxidantes y capturadores de radicales libres; 3) metabolismo; 4) otras proteínas que no pueden ser clasificadas en una categoría general, por ejemplo: precursores de apolipoproteína A o haptoglobina (Georgiou y col., 2005).

Por otro lado, la incubación con espermatozoides vivos y móviles estimula la producción y secreción de prostaglandinas en las células epiteliales del oviducto bovino a través de un aumento en la expresión de los mensajeros de las enzimas ciclooxigenasa-2 (COX-2); prostaglandina E2 sintasa (PGES) y prostaglandina F2 $\alpha$  sintasa (PGFS) (Kodithuwakku y col., 2007).

En general, la mayoría de estos componentes oviductales que son modificados por la interacción con los espermatozoides, participan en la maduración, la viabilidad y la funcionalidad de las gametas (Aldarmahi y col., 2012).

#### ***4.4. Regulación de la función espermática por parte del oviducto***

Las interacciones moleculares entre la superficie del espermatozoide y el tracto genital femenino son esenciales para un apropiado ascenso de los espermatozoides y la consecuente fecundación del oocito (Yanagimachi, 2009). Son numerosos los efectos descritos sobre la función espermática dado por el tránsito de los espermatozoides por el oviducto. Estudios realizados en distintos animales domésticos revelaron que la incubación de los espermatozoides con secreciones oviductales recolectadas durante el estro estimula la

captación de oxígeno de los espermatozoides (Killian, 2011). Además, las secreciones oviductales inducen la capacitación espermática, la reacción acrosomal, afectan la unión del espermatozoide con la zona pellucida, facilitan la fecundación, la motilidad espermática y la sobrevivencia de los espermatozoides (Rodríguez-Martínez, 2007).

#### ***4.5. Liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal***

Si bien aun no se conocen en detalle los mecanismos moleculares que intervienen en la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal, se sabe que este proceso es modulado por el ciclo estral de la hembra, siendo mayor la liberación en el momento periovulatorio (Suárez, 2002, 2008).

Debido a que la formación del reservorio implica interacciones moleculares complejas que involucran residuos glicosilados del oviducto y lectinas espermáticas se han propuesto varias hipótesis para la liberación de los espermatozoides del oviducto. La mayoría de ellas apuntan a cambios que ocurren en los espermatozoides durante su almacenamiento en el reservorio ya que se ha demostrado que no se producen cambios en la exposición de los residuos glicosilados expuestos en el epitelio oviductal durante el período periovulatorio (Suárez y col., 1991).

Por otro lado, la capacidad de unión de los espermatozoides capacitados al epitelio oviductal es menor respecto a los no capacitados (Lefebvre y Suárez, 1996; Fazeli y col., 1999). Por ello es que entre los mecanismos de liberación propuestos se encuentran los cambios que ocurren en la membrana de la cabeza de los espermatozoides durante la capacitación espermática, cambios en el patrón de motilidad que ocurren a los espermatozoides durante la hiperactivación o una combinación de ambos (Suárez, 2002; Coy y col., 2012).

Durante el período periovulatorio se produce un influjo de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el fluido oviductal hacia los espermatozoides que se encuentran unidos al oviducto. Este incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  es una de las principales causas del remodelado estructural y de superficie de la membrana plasmática que ocurre durante la capacitación espermática (Petrunkina y col., 2001). Se postula que este remodelado de la membrana podría modificar la exposición de las moléculas de unión entre los espermatozoides y el epitelio oviductal (Coy y col., 2012). En concordancia con estos resultados, Revah y col. (2000) demostraron que durante la capacitación espermática en bovinos se pierden o modifican proteínas de la membrana disminuyendo la afinidad por los residuos fucosilados del oviducto (Revah y col., 2000). Gwathmey y col. demostraron que durante la capacitación espermática en bovinos desaparece la proteína BSP1 de la cabeza del espermatozoide (Gwathmey y col., 2003). A partir de estos



resultados, estos autores propusieron que la pérdida de todas las BSP durante la capacitación sería un mecanismo de liberación de los espermatozoides del oviducto. Sin embargo, un trabajo reciente demuestra que las distintas BSP (1, 3 y 5) responden diferencialmente a las condiciones capacitantes del medio (Hung y Suarez, 2012). Estas diferencias podrían estar dadas por las diferentes tasas de remoción de BSP1 (lenta) y BSP5 (rápida) de la membrana del espermatozoide, mientras que BSP3 es modificada sin ser removida (Hung y Suarez, 2012). Sumado esto al hecho de que cada una de estas BSP interacciona con más de una ANXA, el mecanismo de liberación de los espermatozoides del reservorio es un proceso dinámico y complejo.

Se propone que en primer lugar las BSP5 de los espermatozoides se unen a ANXA1, ANXA2 y ANXA4; luego durante la capacitación espermática hay una rápida pérdida de BSP5 lo que hace que los espermatozoides pierdan fuerza de unión y puedan impulsarse y liberarse del epitelio. Luego de desplazarse un poco por el lumen del oviducto, los espermatozoides podrían unirse nuevamente vía BSP1 o BSP3 a ANXA5, y este proceso de unión y despegue podría repetirse varias veces (Hung y Suarez, 2012). Si bien aun es necesario profundizar en la investigación en este campo para confirmar este modelo, existen evidencias en ratón que indican que es posible que los espermatozoides que se liberan del reservorio vuelvan a unirse al epitelio varias veces (Chang y Suarez, 2012).

En concordancia con este modelo, se propone que durante la hiperactivación, los espermatozoides adquieren un patrón de motilidad particular que les confiere la fuerza apropiada para despegarse del epitelio oviductal y desplazarse hacia la ampolla oviductal (Suarez, 2002).

Recientemente se han propuesto hipótesis alternativas al modelo de Suarez y col. La primera de ellas se basa en la detección de actividad de glicosidasas dependiente del ciclo estral en el fluido oviductal de bovinos y porcinos (Carrasco y col., 2008a; Carrasco y col., 2008b). Estas enzimas podrían estar actuando sobre residuos glicosilados específicos necesarios para mantener la unión de los espermatozoides al oviducto y de esta manera promover la liberación de los mismos del reservorio (Coy y col., 2012). Otra hipótesis surgió a partir de las investigaciones realizadas en oviductos porcinos que indican que las células epiteliales del mismo secretan una proteína que puede unirse a residuos glicosilados (Song y col., 2010) la cual podría competir con los espermatozoides por los sitios de unión al epitelio oviductal regulando de esta manera el proceso de liberación (Coy y col., 2012).

Como fue mencionado previamente, la formación del reservorio oviductal prolonga la vida media de los espermatozoides hasta que en el período periovulatorio señales específicas inducen la capacitación espermática y la liberación de los mismos (Suarez, 2002). Hasta el



momento es escasa la información acerca de las moléculas presentes en el oviducto que desencadenan estos mecanismos de liberación (Talevi y Gualtieri, 2010). Existen evidencias en porcinos que indican que tanto el complejo cúmulo-oocito como las hormonas ováricas influyen en la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal (Bureau y col., 2002; Brussow y col., 2006; Hunter, 2008). Por otro lado, los glicosaminoglicanos sulfatados (como la heparina y el fucoídan) son potentes inductores de la liberación de los espermatozoides del oviducto y modulan progresivamente la capacitación espermática en bovinos (Talevi y Gualtieri, 2001; Gualtieri y col., 2005). Además, moléculas antioxidantes como el glutatión reducido (GSH) también inducen la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal (Talevi y col., 2007). Es interesante destacar que estas moléculas están presentes en el fluido oviductal bovino y son reguladas por el ciclo estral, encontrándose su mayor concentración en el momento periovulatorio (Lee y Ax, 1984; Lapointe y Bilodeau, 2003; Bergqvist y Rodriguez-Martinez, 2006).

Aun se desconoce el origen de estas moléculas inductoras *in vivo*; las mismas podrían ser secretadas por el epitelio oviductal bajo la influencia de hormonas, estar presentes en los complejos cúmulo-oocito o provenir del fluido folicular (Hunter, 2012). Recientemente se ha demostrado que medios condicionados provenientes de monocapas de células epiteliales del oviducto promueven la liberación de espermatozoides unidos a explantos oviductales, indicando que el epitelio oviductal secreta factores aún desconocidos que participan en la regulación de la interacción espermatozoide-oviducto (Gualtieri y col., 2012).

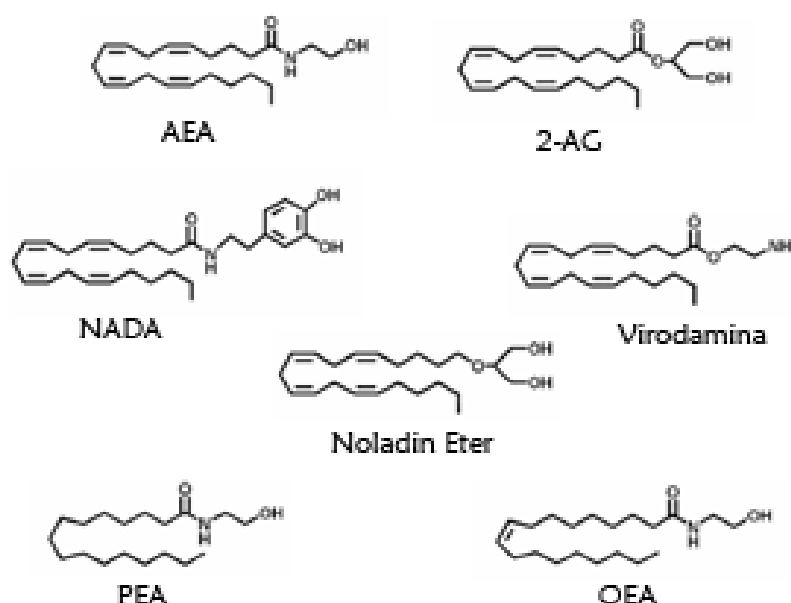
## 5. El sistema endocannabinoide

Los endocannabinoides son mediadores lipídicos aislados de cerebro y tejidos periféricos que incluyen amidas, ésteres y éteres de ácidos grasos de cadena larga poli-insaturada. Estas moléculas tienen efecto sobre diferentes procesos biológicos vía receptores específicos del mismo modo que el principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*: el  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) (Battista y col., 2012).

El sistema endocannabinoide es un sistema de señales que participa en una gran variedad de eventos fisiológicos. Sus principales componentes son los endocannabinoides, las enzimas de síntesis y degradación de los mismos, y los receptores específicos que pueden ser activados por endocannabinoides (Pagotto y col., 2006).

### 5.1. Endocannabinoides

Varios son los endocannabinoides descritos hasta el momento. Entre los más estudiados y que poseen mayor actividad biológica se encuentran la *N*-araquidoniletanolamida (anandamida; AEA) y el 2-araquidonilglicerol (2-AG). Además, la familia de endocannabinoides incluye otras moléculas lipídicas derivadas de ácidos grasos poliinsaturados tales como: *O*-araquidoniletanolamina (virodamina), noladin éter y *N*-araquidonildopamina (NADA), junto con *N*-aciletanolamidas (NAEs) relacionadas tales como: palmitoiletanolamida (PEA) y oleoiletanolamida (OEA) (Figura 8) (Battista y col., 2012).



**Figura 8.** Estructura química de los principales endocannabinoides y otras NAEs relacionadas. AEA: anandamida; 2-AG: 2-araquidonilglicerol; NADA: *N*-araquidonildopamina; PEA: palmitoiletanolamida; OEA: oleoiletanolamida.

La AEA fue aislada e identificada por primera vez en el año 1992 como una molécula capaz de unirse a los receptores de cannabinoides tipo 1 (CB1) a partir de un extracto lipídico obtenido de cerebro de cerdo (Devane y col., 1992). Dos años más tarde fue demostrado que esta molécula es un potente agonista de estos receptores ya que los activa en forma específica mientras que otras amidas y ésteres derivados del ácido araquidónico (PGE2, PGA2, PGB2, PGB1) no lo activan (Childers y col., 1994; Pinto y col., 1994). En los últimos años se ha demostrado que la AEA, además de ser un ligando endógeno de los receptores de

cannabinoides CB1 y CB2, es agonista de los receptores vanilloides TRPV1 (Di Marzo y col., 2001; Piomelli, 2001).

Entre los efectos fisiológicos conocidos de la AEA se encuentran la hipotermia, la anti-nocicepción, la vasodilatación y la anti-inflamación (Zygmunt y col., 1999). Además, esta molécula ha sido implicada en diversos procesos fisiológicos y patológicos tales como analgesia, regulación del tono vascular, obesidad, cáncer, esquizofrenia y esclerosis múltiple (Pacher y col., 2006).

La AEA puede ser secretada en conjunto con OEA y PEA (McFarland y Barker, 2004). Debido a que todas estas moléculas pertenecen a la familia de las NAEs, la principal vía de síntesis y de degradación de AEA es la misma que la de OEA y PEA (Matias y col., 2007). Se cree que estas moléculas co-secretadas con AEA podrían tener un efecto potenciador del efecto de AEA al disminuir su metabolización (Jonsson y col., 2001). Sin embargo, se han descrito algunas funciones específicas de OEA y PEA, entre ellas: la regulación de la ingesta de alimentos y la lipogénesis por OEA (Matias y col., 2007); y las propiedades anti-inflamatorias y de anti-nocicepción de la PEA (Lambert y col., 2002).

## ***5.2. Metabolismo de endocannabinoides***

La actividad biológica de AEA depende del control metabólico llevado a cabo por las vías biosintéticas, catabólicas y oxidativas. La captación celular de AEA y el tráfico intracelular de la misma son pasos críticos en este proceso (Maccarrone y col., 2010).

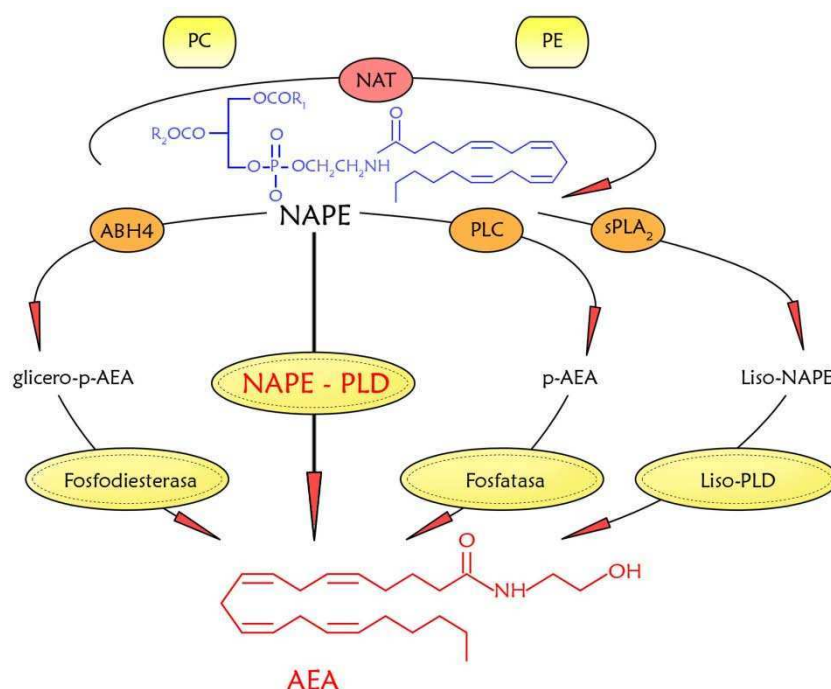
Los endocannabinoides son moléculas que se producen principalmente “a demanda” a partir de precursores que forman parte de los fosfolípidos de las membranas biológicas (Muccioli y col., 2010).

## ***5.3. Síntesis de AEA***

Existen diversas vías metabólicas descritas para la síntesis de AEA (Figura 9) (Maccarrone y col., 2010).

La enzima N-acil-transferasa (NAT) cataliza la transferencia de araquidonato de una fosfatidilcolina de fosfolípidos de membrana al grupo amino de una fosfatidiletanolamina por un mecanismo dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  para formar el precursor de membrana N-Acil-fosfatidiletanolamida (NAPE) (Di Marzo y col., 1994; Cadas y col., 1997). En el año 1994, el grupo de Di Marzo demostró que la formación y liberación de AEA se produce a partir del clivaje de NAPE por una fosfodiesterasa con propiedades similares a la de la fosfolipasa D (PLD) (Di Marzo y col., 1994). Esta enzima fue identificada y descrita como una nueva PLD con

actividad específica para producir NAEs (Petersen y Hansen, 1999). Años más tarde, el grupo de Okamoto nombró a esta enzima como N-acil-fosfatidil-etanolamida fosfolipasa D (NAPE-PLD) ya que confirmó que la misma es la principal responsable de la formación de AEA y de otras NAEs endógenas como OEA y PEA (Okamoto y col., 2004).



**Figura 9.** Metabolismo de anandamida (AEA). Múltiples vías de síntesis de AEA. PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; NAT: N-aciltransferasa. Modificado de (Maccarrone y col., 2010).

Actualmente está bien establecido que la principal vía de síntesis de AEA es catalizada por la enzima NAPE-PLD e involucra al precursor de membrana NAPE.

En los últimos años se han propuesto otras vías de síntesis de AEA a partir del precursor de membrana NAPE. La enzima fosfolipasa C (PLC) puede clivar NAPE y producir fosfo-AEA (p-AEA) que luego es desfosforilada por una fosfatasa (Liu y col., 2006). También la fosfolipasa A<sub>2</sub> secretora (sPLA<sub>2</sub>) puede hidrolizar NAPE a N-araquidonil-liso-fosfatidiletanolamida (Liso-NAPE) que luego es hidrolizada a AEA por la enzima liso-fosfolipasa D (Liso-PLD) (Sun y col., 2004). Finalmente, la molécula precursora NAPE puede ser desacetilada por el complejo

enzimático  $\alpha/\beta$ -hidrolasa 4 (ABH4) generando glicero-fosfo-AEA (glicero-p-AEA) que luego es clivada a AEA por una fosfodiesterasa (Simon y Cravatt, 2006).

Una vez sintetizada, la AEA es liberada al espacio intersticial donde puede actuar en forma autócrina o parácrina.

#### **5.4. Transporte de AEA**

La AEA es una molécula particular, ya que puede activar diferentes vías de señalización a través de receptores con diferente localización dentro de la célula. Más aun, el sitio activo de los distintos receptores pueden ser tanto extracelular como intracelular (Maccarrone y col., 2010). Por lo tanto, el transporte y la captación celular de AEA son eventos importantes a tener en cuenta al momento de analizar las diferentes vías de señalización que activa esta molécula.

El mecanismo de transporte de AEA a través de la membrana plasmática es un proceso que aun no ha sido completamente elucidado. En la actualidad existen diversas hipótesis que explican este transporte: 1) por difusión pasiva a través de la membrana que puede ser asistida por la formación de complejos AEA-colesterol (Di Pasquale y col., 2009); 2) por transporte facilitado por un transportador putativo aún no clonado (Hillard y Jarrahian, 2003) ó 3) por endocitosis mediada por caveolina, proteína presente en los dominios de membrana denominados “lipid raft” (Yates y Barker, 2009).

Por sus propiedades lipofílicas, la AEA debe interactuar con transportadores solubles a fin de ser eficientemente distribuida en los distintos sitios intracelulares (Maccarrone y col., 2010). En los últimos años han sido identificadas las proteínas albúmina y HSP70 como posibles moléculas transportadoras solubles de AEA (Oddi y col., 2009).

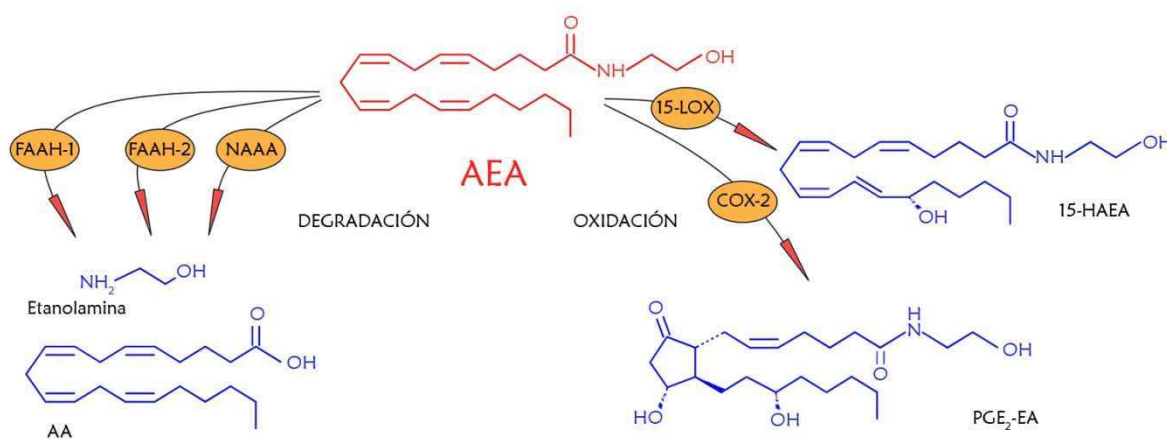
Por otro lado, recientemente se ha descripto que la AEA puede ser almacenada intracelularmente en adiposomas, y que los mismos podrían encontrarse asociados a las enzimas que catabolizan AEA (Maccarrone y col., 2010). Este podría ser un paso de regulación metabólica de esta molécula que controle y mantenga un “tono” de AEA adecuado en la célula (Maccarrone y col., 2010).

#### **5.5. Degradación de AEA**

Varias son las vías de degradación de AEA (Figura 10), siendo la principal la hidrólisis a ácido araquidónico y etanolamina catalizada por la enzima de membrana conocida como hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH, por su denominación en inglés)(Cravatt y col., 1996). Esta enzima es crucial en el control de los niveles endógenos de AEA *in vivo*. Se ha

informado que los ratones *knock out* para el gen de FAAH o los ratones tratados con inhibidores de esta enzima, no pueden degradar amidas de ácidos grasos y muestran hipersensibilidad a los efectos farmacológicos de estos lípidos (Cravatt y col., 2001; Kathuria y col., 2003; Lichtman y col., 2004). Además, la inhibición de la actividad de FAAH aumenta los niveles endógenos de amidas de ácidos grasos tanto en el sistema nervioso central (Cravatt y col., 2001; Kathuria y col., 2003; Lichtman y col., 2004) como en tejidos periféricos (Cravatt y col., 2004).

En los últimos años se ha descrito una segunda isoforma de FAAH (denominada FAAH-2) que también hidroliza NAEs (Wei y col., 2006). La distribución filogenética de FAAH-2 es inusual ya que esta isoforma fue encontrada en humanos, elefantes y conejos; pero no en perros, ovejas, vacas, cerdos o roedores (Wei y col., 2006).



**Figura 10.** Metabolismo de AEA. Múltiples vías de degradación y oxidación.

Existe una vía adicional de degradación de AEA que involucra la participación de la enzima lisosomal N-acil-etanolamina-hidrolasa amidasa ácida (NAAA, por su denominación en inglés). Esta enzima es funcional a pH ácido (4,5-5) y también degrada AEA a ácido araquidónico y etanolamina (Wei y col., 2006).

Cabe destacar que si bien AEA puede ser degradada por FAAH-2 y NAAA, los principales sustratos de estas enzimas son OEA y PEA respectivamente (Wei y col., 2006; Ueda y col., 2010).

Por otro lado, la oxidación es otra vía de metabolización de AEA. Esta molécula puede ser oxidada a 15-hidroxi-AEA (15-HAEA) por el complejo citocromo P450 o por la enzima 15-lipo-

oxigenasa (15-LOX)(Bornheim y col., 1995; Ueda y col., 1995). Adicionalmente, la AEA puede ser oxidada por la enzima COX-2 a prostaglandina E<sub>2</sub>-etanolamida (PGE<sub>2</sub>-EA)(Yu y col., 1997).

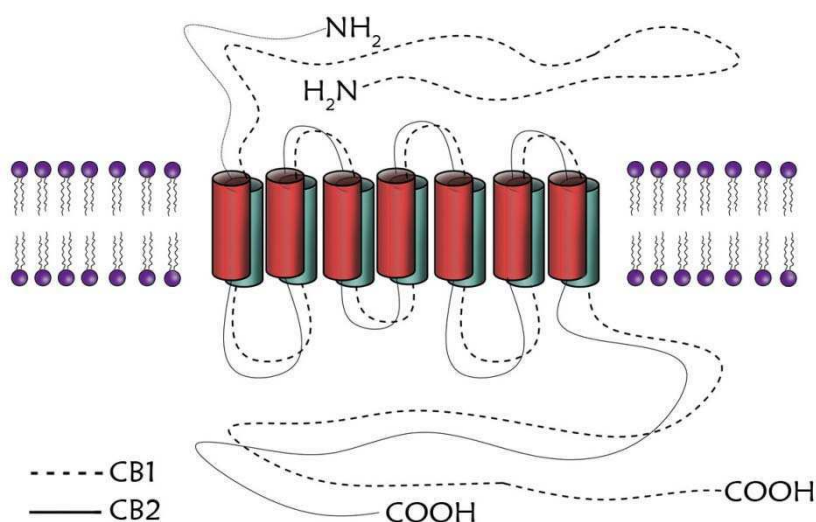
### 5.6. Receptores

Durante muchos años se creyó que los efectos de los cannabinoides estaban mediados por acciones no específicas en la membrana plasmática de las células (Roth y Williams, 1979). Sin embargo, años más tarde fueron clonados e identificados los receptores que son blancos farmacológicos del  $\Delta^9$ -THC y otros cannabinoides. Estos receptores fueron denominados receptores de cannabinoides (CBs).

Hoy en día se conoce que los endocannabinoides, en particular la AEA, pueden activar los receptores CBs, los receptores vanilloides (TRPV1) y los receptores nucleares PPAR $\alpha$  tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Battista y col., 2012).

### 5.7. Receptores de cannabinoides (CBs)

Hasta el momento han sido descritos y clonados 2 subtipos de receptores cannabinoides que unen  $\Delta^9$ -THC con alta afinidad: el receptor de cannabinoides tipo 1 (CB1) y el receptor de cannabinoides tipo 2 (CB2).



**Figura 11.** Esquema representativo de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2.



Tanto CB1 como CB2 pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR). Como otros GPCRs, estos receptores contienen un dominio extracelular amino terminal glicosilado, 7 dominios  $\alpha$ -hélice transmembrana y un dominio carboxi-terminal intracelular (Figura 11). Sus respuestas funcionales son mediadas por proteínas que unen GTP y que son sensibles a la toxina pertussis ( $G_{i/o}$ ) (Matsuda y col., 1990; Devane y col., 1992; Munro y col., 1993).

Los receptores CB1 y CB2 únicamente difieren en 14 aminoácidos en su extremo carboxi-terminal, por ello comparten algunos ligandos y sus vías de señalización son similares. El extremo carboxi-terminal de CB1 contiene numerosos residuos de serina y treonina (11 y 5, respectivamente) que pueden ser fosforilados y de esta manera participar en la asociación con proteínas regulatorias y/o segundos mensajeros (Gurevich y Gurevich, 2006).

Los receptores CB1 fueron caracterizados por primera vez en cerebro de rata (Devane y col., 1988), y se expresan predominantemente en el sistema nervioso central y periférico (Matsuda y col., 1990) aunque también se demostró que están presentes en otros tejidos.

Los receptores CB2 fueron caracterizados por primera vez en macrófagos de la zona marginal del bazo y se expresan principalmente en células del sistema inmune (Munro y col., 1993).

Los receptores CB1, pero no los CB2, se encuentran asociados a microdominios especiales de membrana denominados “*lipid rafts*”, y ha sido demostrado que éstos pueden modular las vías de señalización de CB1. En particular, la relación funcional entre los receptores CB1 y los *lipid rafts* depende del contenido de colesterol en las membranas celulares; se ha demostrado en experimentos *in vitro* con cultivos primarios o líneas celulares inmortalizadas que el enriquecimiento en colesterol en las membranas reduce la activación de CB1 (Bari y col., 2005a; Bari y col., 2005b).

La exposición prolongada a agonistas de CB1 genera tolerancia atenuando la respuesta funcional (Martin y col., 2004). Este efecto puede deberse tanto a la disminución de la habilidad del receptor para activar vías efectoras (por ejemplo desensibilización) como a un cambio en el número de receptores presentes en la superficie de membrana dado por la internalización del mismo (Gainetdinov y col., 2004). La fosforilación de ciertos residuos regula el mecanismo de desensibilización pero no de internalización de los receptores CB1 (Daigle y col., 2008). Los mecanismos de internalización y reciclado de CB1 son aun desconocidos (Stadel y col., 2011).

La AEA es un potente agonista de los receptores CBs. En general, los agonistas endógenos muestran poca selectividad diferencial entre CB1 y CB2, mientras que los antagonistas son altamente selectivos. La selectividad de estos antagonistas permite utilizarlos como herramienta



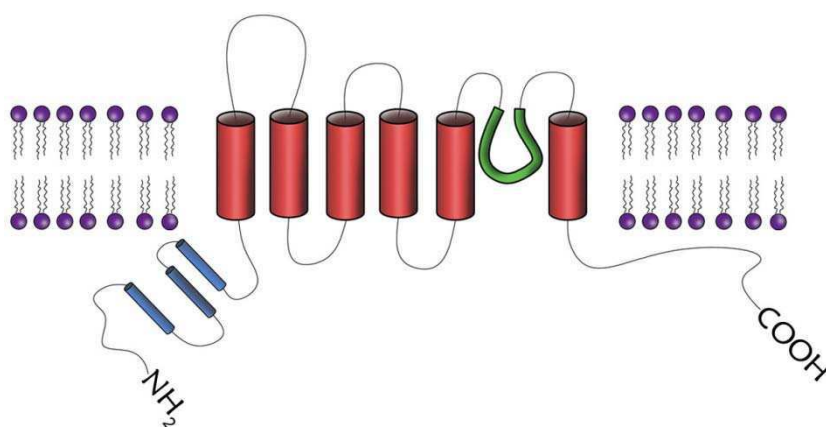
farmacológica y de esta manera discriminar efectos mediados por uno u otro receptor *in vitro* e *in vivo* (Console-Bram y col., 2012).

Entre los efectos desencadenados por activación de los receptores CBs se ha reportado la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; la inhibición de la adenilato ciclasa con la consecuente disminución de proteínas quinasas dependientes de AMPc; regulación de corrientes iónicas; activación de cascadas de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), especialmente las cascadas de ERK y p38 MAPK; y la estimulación de otras vías intracelulares tales como la vía de PI3K/Akt a través de CB2 (Battista y col., 2012).

### 5.8. Receptores de vanilloides TRPVs

La AEA también puede actuar como agonista de los receptores TRPV1. Estos receptores son canales de cationes no selectivos que pertenecen a la superfamilia de canales iónicos TRP (por su denominación en inglés) (Caterina y col., 1997).

Tal como otros miembros de los TRP, los receptores TRPV1 se caracterizan por poseer 6 dominios de paso transmembrana con dominios amino-terminal y carboxi-terminal largos e intracelulares (Gunthorpe y col., 2002). Poseen un segmento hidrofóbico corto entre los pasos transmembrana 5 y 6 el cual estaría formando parte del poro del canal. En el extremo amino-terminal contiene dominios de repetición de anquirinas como posibles sitios de interacción con otras proteínas o posibles sitios de fosforilación (Figura 12) (O'Neil y Brown, 2003).



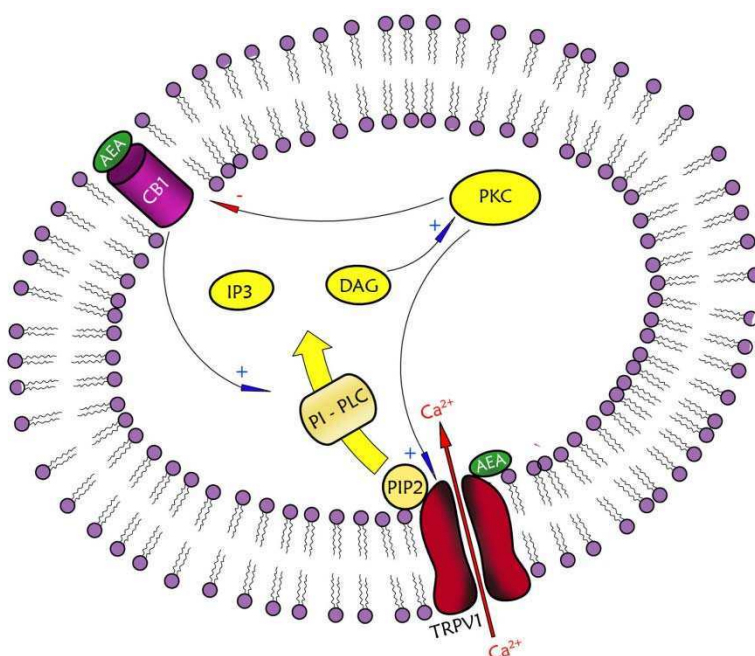
**Figura 12.** Esquema representativo de los receptores de vanilloides TRPV1.

Los receptores TRPV1 se encuentran altamente expresados en neuronas sensoriales, con una moderada expresión en otros tejidos y órganos tales como páncreas, cerebro, hígado, vejiga, riñón, intestino, células endoteliales, linfocitos, entre otros (O'Neil y Brown, 2003).

Estos receptores pueden ser activados por varios agonistas, entre ellos se encuentran la capsaicina y otros vanilloides. La AEA y algunos metabolitos del ácido araquidónico pueden estimular o potenciar la actividad de estos canales (O'Neil y Brown, 2003). El sitio de unión de AEA al receptor TRPV1 es el mismo sitio de unión intracelular al que se une capsaicina (Jordt y Julius, 2002). La activación de TRPV1 produce un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la activación de mecanismos de acción que involucran a este segundo mensajero (Ross, 2003).

Además, la activación de este canal puede verse influenciada por una serie de señales y/o eventos regulatorios incluyendo: modificaciones post-traduccionales tales como fosforilación por distintas quinasas, modulación alostérica por temperatura, la acidez del medio, el potencial de membrana, ciertos fosfolípidos de membrana (en particular la presencia de fosfatidil-inositol bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ) que inhibe tónicamente a TRPV1), entre otros (Pertwee y col., 2010). Es interesante destacar que otras NAEs tales como PEA pueden incrementar la afinidad de AEA como ligando de estos receptores (De Petrocellis y col., 2001a).

Por otro lado, la actividad funcional de AEA sobre TRPV1 puede ser modulada por la activación de los receptores CB1, especialmente en células en las que se co-expresan estos 2 receptores (Hermann y col., 2003). En ciertos sistemas, la sensibilización de TRPV1 requiere la activación por parte de CB1 de una PLC que degrada  $\text{PIP}_2$  liberando la inhibición tónica que este tiene sobre TRPV1 (Figura 13) (Hermann y col., 2003).



**Figura 13.** Vías moleculares de interacción entre los receptores CB1 y TRPV1.

En los últimos años ha sido reportado que la activación de los receptores TRPV1 por AEA induce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, incrementa la actividad de la vía de caspasas, estimula desacoplamiento mitocondrial y quinasas pro-apoptóticas (Battista y col., 2012).

### **5.9. El sistema endocannabinoide en reproducción**

Los endocannabinoides poseen funciones biológicas tanto a nivel central como periférico. En los últimos años, varios trabajos consideran a estos mediadores lipídicos junto con las hormonas sexuales y las citoquinas como señales críticas en diferentes eventos relacionados a la fisiología reproductiva.

### **5.10. El sistema endocannabinoide en el tracto reproductor.**

Varios estudios se centraron en la caracterización de la distribución y función del sistema endocannabinoide en órganos reproductivos en diferentes modelos animales.

Las principales enzimas del metabolismo de AEA y sus receptores, han sido descritos en diversos tejidos reproductivos femeninos de distintas especies (Tabla 2).

<b>Tipo celular/ tejido</b>	<b>Componente del sistema endocannabinoide</b>	<b>Cita</b>
Endometrio y trompas de Fallopio	CB1, CB2, FAAH, NAPE-PLD	Horne y col., 2008; Gebeh y col., 2012
Oviducto	CB1, CB2, FAAH, NAPE-PLD	Wang y col., 2004; Wang y col., 2006b; Gervasi y col., 2009
Útero	CB1, FAAH, NAPE-PLD	Guo y col., 2005; Wang y col., 2006c; Wang y col., 2007; Ribeiro y col., 2009; Sordelli y col., 2011
Ovario	CB1, CB2, FAAH, NAPE-PLD	El-Talatini y col., 2009a
Placenta	CB1, CB2, NAPE-PLD, FAAH TRPV1 (deciduas)	Taylor y col., 2007; Cella y col., 2008; Fonseca y col., 2009; Aban y col., 2013
Embriones	CB1, CB2, NAPE-PLD, FAAH	Paria y col., 1995; Wang y col., 2004; Wang y col., 2006c

**Tabla 2.** Expresión de los distintos componentes del sistema endocannabinoide en hembras.

A su vez, algunos de los componentes del sistema endocannabinoide han sido descritos también en diversas células y tejidos reproductivos masculinos (Tabla 3).

<b>Tipo celular/ tejido</b>	<b>Componente del sistema endocannabinoide</b>	<b>Cita</b>
Testículos	CB1, FAAH	Sugiura y col., 1996; Gye y col., 2005; Cobellis y col., 2006; Cacciola y col., 2008a
Células de Sertoli	CB1, CB2, FAAH	Maccarrone y col., 2003b; Rossi y col., 2007; Grimaldi y col., 2009
Células de Leydig	CB1	Gye y col., 2005; Cacciola y col., 2008b
Espermatogonias	CB2, CB1	Gye y col., 2005; Grimaldi y col., 2009
Epidídimo	CB1	Ricci y col., 2007
Espermatozoides	NAPE-PLD, FAAH, CB1, CB2, TRPV1	Maccarrone y col., 2005; Rossato y col., 2005; Cobellis y col., 2006; Francavilla y col., 2009; Gervasi y col., 2009; Agirregoitia y col., 2010; Bernabo y col., 2010

**Tabla 3.** Expresión de los distintos componentes del sistema endocannabinoide en machos.

Como se ha mencionado previamente, la acción de la AEA depende de su concentración en el espacio extracelular, la cual está regulada principalmente por las vías de síntesis, transporte y degradación de la misma. Las concentraciones fisiológicas de AEA detectadas en plasma y en diversos fluidos reproductivos se encuentran en el orden nanomolar (Tabla 4).

Fluido	Especie	Concentración de AEA	Cita
Plasma	rata	2,9 nM	Giuffrida y col., 2000
Plasma	ratón	1,9 nM	Obata y col., 2003
		1,1 nM	Liu y col. 2009
Plasma	humanos	2 nM	Sparling y col., 2003
		0,6 nM	Marczylo y col., 2009
		1,4 nM	Zoerner y col., 2009
Leche	humanos	0,1 nM	Marczylo y col., 2009
Plasma seminal	humanos	0,2 nM	Amoako y col., 2010
		12,1 nM	Schuel y col., 2002a
Fluido oviductal de mitad del ciclo	humanos	10,7 nM	Schuel y col., 2002a
Fluido folicular	humanos	2,9 nM	Schuel y col., 2002a

**Tabla 4.** Concentración de AEA en distintos fluidos.

### 5.11. Participación de la AEA en eventos reproductivos

La AEA está involucrada en muchas de las funciones reproductivas femeninas estudiadas hasta el momento, entre ellas la secreción de hormonas sexuales por la hipófisis, la gametogénesis, la ovulación, el desarrollo embrionario temprano, la implantación y el crecimiento fetal (Bari y col., 2011).

Por ejemplo, además de participar en el proceso de implantación, la AEA está involucrada en el desarrollo, el crecimiento y la invasión del trofoblasto en ratas (Fonseca y col., 2009; Sun y col., 2010).

Por su parte, se ha sugerido la existencia de un gradiente de AEA dado por la expresión diferencial espacio-temporal de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en el oviducto, generando un tono adecuado de AEA para la correcta función del mismo (Wang y col., 2004; Schuel, 2006; Wang y col., 2006c).

Si bien las enzimas del metabolismo de la AEA (especialmente la FAAH) son componentes importantes que regulan los niveles fisiológicos de este endocannabinoide, los receptores CBs también son parte fundamental de este sistema. Se ha demostrado que ratones *knock out* deficientes en CB1 y CB2 tienen menor tasa de preñez que los ratones salvajes (Wang y col., 2004; Sun y Dey, 2008). Esto estaría relacionado con el hecho de que en ratones CB1-/- los

embriones quedan retenidos en el oviducto por períodos prolongados, lo que indica que los mismos poseen fallas en el transporte oviductal (Wang y col., 2004). Por otro lado, los ratones CB2-/- mostraron fallas en la eclosión de los embriones sugiriendo que la activación de las vías de señalización de estos receptores son necesarios para el desarrollo embrionario (Wang y col., 2004).

Receptor	Efecto en reproducción del macho	Efecto en reproducción de la hembra
CB1	Control de la viabilidad y adquisición de la motilidad en espermatozoides	Transporte oviductal de embriones
	Modulación del balance energético	Supervivencia del embrión o muerte celular programada
	Inhibición de la reacción acrosomal inducida por zona pelúcida	Implantación y desarrollo embrionario Inmunoregulación de la gestación Placentación Parto
CB2	Inducción de la espermatogénesis	Desarrollo embrionario
	Regulación de la motilidad de los espermatozoides Efecto anti-apoptótico en células de Sertoli	Bloqueo de la proliferación celular del trofoblasto
TRPV1	Prevención de la reacción acrosomal espontánea	
	Control de la interacción espermatozoide-oocito	
	Reducción de la meiosis de células germinales	
	Incremento de apoptosis de las espermatogonias	
	Protección frente a estrés testicular dado por calor	

**Tabla 5.** Principales efectos de AEA sobre eventos reproductivos. Modificado de (Bari y col., 2011).

En relación a los machos, la AEA también participa en diferentes eventos reproductivos tales como la espermatogénesis, la regulación del balance energético y la viabilidad

espermática así como también en la regulación de la motilidad y de la reacción acrosomal (Bari y col., 2011). Además se ha propuesto que la modulación por FSH del número de células de Sertoli en el testículo es mediada por un mecanismo que involucra a la AEA y la activación diferencial de los receptores TRPV1 y CB2 (Maccarrone y col., 2003b).

Por otro lado, estudios recientes, en ratones CB1<sup>-/-</sup>, demostraron que la AEA está involucrada en los mecanismos de regulación de la motilidad de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo, a través de la activación del receptor CB1 (Ricci y col., 2007). Además, la activación de TRPV1 en espermatozoides humanos está involucrada en el proceso de fusión de gametas (Francavilla y col., 2009).

En la Tabla 5 se resumen las principales funciones fisiológicas propuestas para AEA y sus diferentes vías de activación tanto en machos como en hembras.

Las vías de señalización que activa la AEA son esenciales para la regulación de la fisiología de los procesos reproductivos. Una aberración en este sistema de señalización puede afectar severamente estos procesos teniendo consecuencias directas en la fertilidad de los individuos.

Por ejemplo, se ha demostrado que la ocurrencia de abortos espontáneos correlaciona con niveles reducidos de la actividad y expresión de la enzima FAAH en linfocitos periféricos y con la disminución de la expresión de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en placenta durante el primer trimestre de gestación (Maccarrone y col., 2000b; Trabucco y col., 2009).

Además, se ha demostrado que una desregulación de los niveles de AEA plasmática correlaciona con la ocurrencia de partos pre-término (Nallendran y col., 2010) y que niveles fisiológicos de AEA plasmática correlacionan con una tasa de preñez normal en ratas y humanos (Habayeb y col., 2004; Fonseca y col., 2010; Taylor y col., 2010).

En machos, la exposición de espermatozoides a elevados niveles de AEA (concentraciones micromolares) es responsable de la disminución de la motilidad y la viabilidad espermática, además de la inducción de apoptosis en células de Sertoli (Battista y col., 2012). Sumado a esto, Maccarrone y col. (2005) demostraron que concentraciones micromolares de AEA inhiben la capacitación espermática a través de CB1 y la reacción acrosomal espontánea vía la activación de TRPV1 en espermatozoides de cerdos.

Recientemente Sun y col. (2009) han reportado que ratones *knock out* para la enzima FAAH (faah<sup>-/-</sup>), poseen elevados niveles de AEA en el tracto reproductor del macho. Los resultados de los estudios de fecundación *in vitro* (FIV) con espermatozoides provenientes de ratones faah<sup>-/-</sup>, indicaron una disminución en el porcentaje de oocitos fecundados. El análisis de los datos indicó que los espermatozoides de ratones faah<sup>-/-</sup> presentan fallas en la motilidad espermática y por lo tanto en su capacidad de atravesar la zona pelúcida y fecundar al oocito exitosamente. Este defecto es rescatado por la eliminación del receptor CB1, ya que los



espermatozoides de los ratones *faah*  $-/-$  y *Cb1*  $-/-$  poseen capacidad fecundante similar a los salvajes. Estos resultados indican que la alteración de la función normal del espermatozoide por concentraciones elevadas de AEA sería a través de CB1.

Por otro lado, Schuel y col. (2002b) utilizando un análogo estable de la AEA (Meta-anandamida, Met-AEA), demostraron que dicho compuesto tiene un efecto bifásico en la hiperactivación de los espermatozoides de humanos: mientras que 2,5 nM de Met-AEA inhibe este proceso, 0,25 nM de Met-AEA lo estimula.

Estas evidencias indican que altos niveles de AEA producen una disminución de la capacidad fecundante del espermatozoide sin embargo concentraciones fisiológicas podrían favorecerla.

Cabe destacar que los distintos componentes del sistema endocannabinoide forman parte de una red compleja de interacción entre moléculas que incluye a las hormonas sexuales y las citoquinas que regulan diversos procesos reproductivos. Un defecto en las vías moleculares que involucran a la AEA en los órganos reproductivos podría conducir a causas de infertilidad aun sin explicación.

### **5.12. Interacción entre el sistema endocannabinoide y las hormonas ováricas**

Como fue mencionado previamente, existen evidencias que indican la importancia de los endocannabinoides en eventos reproductivos tales como la foliculogénesis, la espermatogénesis, la fecundación, el transporte oviductal, la implantación y el desarrollo embrionario. Es sabido que estos procesos están regulados por las hormonas ováricas: E y P. En los últimos años han surgido estudios que relacionan al sistema endocannabinoide con estas hormonas demostrando que existen efectos directos de estos esteroides sobre algunos de los componentes de este sistema a través de vías de regulación genómicas y no genómicas (Maccarrone y col., 2000a; Maccarrone y col., 2000b; Maccarrone y col., 2003a; Maccarrone y col., 2003c). Tanto la P como el E están involucrados en la regulación y mantenimiento de los niveles de endocannabinoides a través de la modulación de las principales enzimas del metabolismo de los mismos. En linfocitos de sangre periférica, la P disminuye los niveles de AEA ya que incrementa la expresión y actividad de la enzima FAAH (Maccarrone y col., 2001; Maccarrone y col., 2003a). En cambio, en células endoteliales de la vena umbilical de humanos el E aumenta los niveles de AEA ya que incrementa la actividad de la enzima NAPE-PLD y disminuye la actividad de FAAH a través de la activación de una vía no genómica (Maccarrone y col., 2002a).



Por otro lado, se ha demostrado que tanto el E como la P disminuyen la expresión de NAPE-PLD en útero durante la preñez temprana de ratones (Guo y col., 2005). Sin embargo estas hormonas también disminuyen la actividad de FAAH por debajo de los niveles basales, por lo tanto es difícil predecir los niveles de AEA en base a las enzimas del metabolismo de la misma en este órgano (Maccarrone y col., 2000a). Más aun, estudios realizados a lo largo del ciclo estral en ratones indican que la actividad y expresión de FAAH varía entre los distintos estadios del mismo, encontrándose los mayores niveles de FAAH durante el proestro, estadio en el que se encuentra la mayor concentración de E y la menor concentración de P en el ciclo (Klinger y col., 2006). En concordancia con estos resultados, se ha reportado que la expresión de FAAH en linfocitos humanos varía a lo largo del ciclo menstrual, encontrándose los mayores niveles de AEA en el día 14 del ciclo apoyando también la posible relación entre las hormonas esteroideas y el sistema endocannabinoide (Lazzarin y col., 2004). Sin embargo, no se ha encontrado correlación entre los niveles plasmáticos de AEA y de E o P durante el ciclo menstrual o durante el embarazo temprano en mujeres (El-Talatini y col., 2009b, 2010).

Por otro lado, es sabido que la espermatogénesis y la sobrevivencia de las células germinales masculinas se encuentran reguladas por el E (Adeoya-Osiguwa y col., 2003; Lassarguere y col., 2003). Las células de Sertoli son la principal fuente de estrógenos testiculares y la hormona folículo estimulante (FSH) puede incrementar la producción de E potenciando la activación del promotor del gen de la enzima aromatasa en estas células (Levallet y Carreau, 1997; Pentikainen y col., 2000). En la actualidad son escasos los trabajos realizados en machos que relacionen al sistema endocannabinoide con las hormonas sexuales. Interesantemente, se ha demostrado que la FSH estimula la expresión y la actividad de FAAH pero no de la enzima NAPE-PLD en células de Sertoli de ratón (Rossi y col., 2007). Estos resultados coinciden con la presencia de un elemento de respuesta a estrógenos en el promotor del gen de FAAH y apoyan la idea de una relación entre los endocannabinoides y las hormonas ováricas también en eventos reproductivos masculinos (Puffenbarger, 2005).

### ***5.13. El sistema endocannabinoide como regulador de la interacción espermatozoide-oviducto en bovinos***

Varios estudios realizados en humanos y porcinos sugieren la posible existencia de un gradiente de AEA en el oviducto que podría regular entre otros, la función espermática (Schuel y col., 2002a; Maccarrone y col., 2005; Schuel y Burkman, 2005; Wang y col., 2006b).

En nuestro laboratorio hemos demostrado que tanto los espermatozoides como las células epiteliales del oviducto (CEO) expresan los receptores CB1, CB2 y TRPV1 en bovinos (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009).

Además, hemos demostrado que concentraciones nanomolares de AEA y/o su análogo estable Met-AEA inhiben la unión y/o liberan a los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y/o TRPV1 pero no de los receptores CB2 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). Sin embargo, concentraciones menores de este endocannabinoide permiten la formación del reservorio oviductal ya que no tienen efecto en la interacción de los espermatozoides con las CEO (Gervasi y col., 2009).

En este sistema, la AEA actúa a través de la activación de la vía de señalización del óxido nítrico ya que el efecto de la misma sobre la liberación de los espermatozoides de las CEO fue revertido por la incubación con un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (L-NAME) o por la incubación con hemoglobina (secuestrador de óxido nítrico) (Oszycka-Salut y col., 2012). Más aun, la AEA induce un incremento de los niveles de óxido nítrico en espermatozoides bovinos pero no en CEO sugiriendo que este endocannabinoide activaría la vía del óxido nítrico en espermatozoides en el proceso de liberación de los mismos de las CEO (Oszycka-Salut y col., 2012).

En resumen, los cambios hormonales que ocurren durante el ciclo estral influyen en la fisiología y función reproductiva. Al llegar al oviducto los espermatozoides se unen a las células epiteliales del mismo y forman el reservorio oviductal hasta que son liberados secuencialmente en el momento peri-ovulatorio. Hasta el momento, es escasa la información acerca de las señales moleculares que regulan el proceso de selección espermática y encuentro coordinado de las gametas que ocurre en el oviducto. En particular, la participación de los endocannabinoides y/o sus receptores en los eventos que contribuyen al proceso de fecundación que ocurre en bovinos no ha sido estudiada.

En este trabajo de tesis se propone que en el momento peri-ovulatorio las hormonas sexuales podrían influenciar el microambiente oviductal modulando los niveles de AEA, y regular de esta manera la capacitación espermática, el momento de escape de los espermatozoides del reservorio en el istmo oviductal y, de este modo, contribuir a la selección del espermatozoide que fecundará al oocito *in vivo*.

En base a los antecedentes de la bibliografía y a los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en este trabajo de tesis proponemos la siguiente hipótesis:

***En el momento peri-ovulatorio, estímulos tales como las hormonas ováricas inducen un aumento en los niveles oviductales de anandamida. El mecanismo de activación de este endocannabinoide desencadena eventos asociados a la capacitación espermática promoviendo de esta manera la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal con capacidad fecundante en bovinos.***

Para demostrar esta hipótesis hemos planteado el siguiente **objetivo general**:

*Estudiar la regulación y el mecanismo de acción de la anandamida en la interacción del espermatozoide con el oviducto en bovinos.*

**Objetivos particulares:**

- 1) Evaluar los niveles de anandamida y otras N-aciletanolamidas presentes en el oviducto bovino durante el ciclo estral y caracterizar las principales enzimas metabólicas de los mismos.
- 2) Analizar una posible relación entre las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.
- 3) Estudiar el mecanismo de acción de la anandamida como un agente capacitante e inductor fisiológico de la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.

## **1. Drogas, Medios y Material Biológico**

### **1.1. Drogas y reactivos**

Los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa, las membranas de nitrocelulosa, el Rojo Ponceau S, la anandamida y la Meta-anandamida, la capsazepina, la heparina, el CTC, el PSA-FICT, la BSA (fracción V), la lana de vidrio y el suero fetal bovino (SFB) fueron proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA).

El luminol y el ácido p-cumárico fueron obtenidos de Fluka (Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina).

El inhibidor de PLC (U73122), el activador de PLC (m-3M3FBS) y la ACEA fueron suministrados por Tocris bioscience, USA.

Los reactivos para Western blot fueron suministrados por Sigma Aldrich y Bio-Rad.

Los anticuerpos secundarios Alexa fluor 555 y Alexa fluor 594 fueron suministrados por Molecular Probes (Invitrogen-Life Technology, Buenos Aires, Argentina).

La gentamicina, la fungizona y el medio M199 fueron obtenidos de Gibco (Buenos Aires, Argentina).

El inhibidor de FAAH (URB597), los estándares internos AEA-d8, PEA-d4, OEA-d2, el agonista del receptor TRPV1 (capsaicina) y el antagonista del receptor TRPV1 (capsazepina) fueron adquiridos de Cayman Chemical.

El material radioactivo utilizado, [<sup>3</sup>H]-anandamida (AEA), fue obtenido de Amersham Corporation (Arlington Heights, IL, USA).

El BAPTA2-AM, el FURA2-AM, los reactivos para la extracción de ARN, la reacción de transcriptasa reversa y la reacción en cadena de la polimerasa fueron obtenidos de Invitrogen Life Technology (Buenos Aires, Argentina).

El antagonista del receptor CB1 (SR141716A) y el del receptor CB2 (SR144528) fueron suministrados por el Laboratorio Sanofi – Aventis (Paris, Francia).

Las placas de sílica gel 60 de aluminio con zona concentradora para cromatografía en placa delgada (TLC) se obtuvieron en Merck (Darmstadt, Alemania).

### **Anticuerpos primarios utilizados**

- Anti FAAH para Western blot fue gentilmente donado por el laboratorio del Dr. Cravatt (The Skaggs Institute for Chemical Biology, California-EEUU).
- FAAH (C-20), anti FAAH para inmunohistoquímica en espermatozoides y CEO, obtenido de Santa Cruz Biotechnology Inc. (California, USA).
- FAAH (200189), anti FAAH para inmunohistoquímica en cortes de oviducto, obtenido de Abbiotec (Reino Unido).

- Anti NAPE-PLD (ab77474) para Western blot e inmunohistoquímica, obtenido de Abcam Inc. (Cambridge, MA, USA).
- Anti fosfotirosina (clon 4G10) para Western blot, obtenido de Upstate (Billerica, USA).
- Anti  $\beta$ -tubulina (clon D66) y anti actina (A2066), obtenidos de Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

El resto de los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

### ***1.1. Soluciones y medios***

#### **TALPm 1X (modificado, sin albúmina) pH=7,4**

99 mM NaCl; 3,1 mM KCl; 0,4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,4 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 21,6 mM Lactato de Na; 10 mM HEPES; 2 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ .

#### **sp-TALPm (modificado, sin albúmina) pH=7,4**

TALPm 1X; 1 mM Na-Piruvato; 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina.

#### **sp-TALP para capacitación pH=7,4**

TALPm 1X; 0,3% BSA ; 1 mM Na-Piruvato; 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina.

#### **Medio de cultivo de células epiteliales del oviducto**

90% (v/v) Medio M199; 10% (v/v) SFB; 0,1 mg/ml gentamicina; 1  $\mu\text{g/ml}$  fungizona.

#### **Diluyente de CTC pH=7,8**

20 mM Tris; 5 mM cisteína; 130 mM NaCl; 0,25 mg/ml clorotetraciclina (CTC).

#### **Buffer fosfato (PBS) pH=7,5**

136,9 mM NaCl; 2,68 mM KCl; 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

#### **TBS pH=7,5**

50 mM Tris/HCl; 500 mM NaCl.

#### **Buffer de corrida de Western blot**

123,8 mM Tris base (pH=8,3); 0,96 M glicina; 17,3 mM SDS.

#### **Buffer de transferencia de Western blot**

25 mM Tris (pH=8,1-8,4); 192 mM glicina; 20% (v/v) metanol.

### **Rojo Ponceau S**

0,5% (p/v) ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo) fenilazo]-2,7-naftalenodisulfónico,  
1% (v/v) ácido acético.

### **Buffer de lisis**

PBS 1X (pH=7,4); 1 mM EDTA; 2  $\mu$ g/ml aprotinina; 10  $\mu$ g/ml leupeptina; 10  $\mu$ g/ml DTT; 100  $\mu$ g/ml STY; 1 mg/ml ácido caproico; 1 mg/ml benzamidina; 0,02% (p/v) azida sódica; 0,1% (p/v) SDS; 0,5% (v/v) deoxicolato; 1% (v/v) nonidet P-40.

### **Buffer de homogeneización de AEA**

10 mM Tris-Hcl; 1 mM de EDTA (pH=7,6).

### **Buffer de reacción de FAAH**

500 mM Tris (pH=8,5).

### **Soluciones para armado de geles de poliacrilamida utilizados**

Concentrador: poliacrilamida 4% (p/v); 10% (p/v) SDS; 0,125 M Tris (pH=6,8).

Separador: poliacrilamida 10% (p/v); 10% (p/v) SDS, 1,5 M Tris (pH=8,8).

### **Buffer muestra**

0,3% (p/v) azul de bromofenol; 0,5 M Tris (pH=6,8); 1% (p/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol; 10% (v/v) glicerol.

### **Soluciones de lavado**

#### **(T-PBS)**

0,1% (v/v) Tween 20 en PBS 1X.

#### **(T-TBS)**

0,1% (v/v) Tween 20 en TBS 1X.

### **Soluciones de bloqueo**

Western blot: 5% (p/v) leche descremada en PBS.

Inmunohistoquímica: 40  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA en PBS.

### **Soluciones de ECL**

1 vol de Sol A + 1 vol de Sol B.

### **Solución A**

0,25 mM luminol; 0,4 mM ácido p-cumárico; 0,1 M Tris/HCl (pH=8,5).

### **Solución B**

0,1 M Tris/HCl (pH=8); 19 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 0,1 M Tris (pH=8).

### **Solución de xilane**

3% (v/v) Xilol en acetona.

### **Líquido de montaje**

Glicerol:PBS en proporción 9:1 (v/v) o líquido de montaje DPX (06522) Sigma Aldrich (Reino Unido).

## ***1.2. Material biológico***

### ***1.3. Oviductos bovinos***

Los oviductos bovinos fueron gentilmente donados por el Frigorífico Rioplatense SA o por el Frigorífico Ipsa Loma Hermosa. Una vez obtenidos se transportaron en hielo al laboratorio hasta su posterior procesamiento.

### ***1.4. Semen bovino criopreservado***

Las dosis de semen bovino criopreservado fueron gentilmente donadas por el Centro de Inseminación Artificial La Elisa (CIALE), por la Cabaña Las Lilas S.A. y por el Centro de Inseminación Artificial Venado Tuerto (CIAVT). Las mismas fueron conservadas en N<sub>2</sub> líquido hasta su utilización.

### ***1.5. Procesamiento del material biológico***

Las dosis de semen fueron descongeladas en un baño térmico a 38°C, el contenido de las mismas fue resuspendido en sp-TALPm y sometido a columnas de lana de vidrio a fin de seleccionar la población de espermatozoides vivos y móviles. Posteriormente los espermatozoides fueron lavados con 10 ml de medio sp-TALPm y centrifugados a 800 g durante 5 min. El procesamiento posterior de los espermatozoides dependió de cada experimento en particular.

Los oviductos provenientes del matadero fueron cuidadosamente separados de los tejidos circundantes y luego procesados para inmunohistoquímica o se obtuvieron las CEO de los mismos para realizar RT-PCR, Western blot, medición de NAEs y cultivos celulares.

### **1.6. Clasificación de los oviductos**

Los oviductos provenientes del matadero fueron clasificados en los distintos estadios del ciclo estral según la morfología del ovario y del cuerpo lúteo tal como fue descrito por (Ireland y col., 1980). Mediante esta técnica pueden identificarse 4 estadios que se corresponden con los distintos momentos del ciclo estral bovino. Estadio I: días 0-5 del ciclo (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10 del ciclo; estadio III: días 11-17 del ciclo; estadio IV: días 18-20 del ciclo (pre-ovulatorio).

## **2. Cultivos primarios de CEO bovinas**

Los cultivos de CEO se realizaron en base a la técnica descrita por (Gualtieri y Talevi, 2000)) con algunas modificaciones.

Los oviductos provenientes del matadero fueron cuidadosamente separados del ovario y del resto de los tejidos asociados (conjuntivo, capilares, grasa). Una vez limpios, los oviductos se mantuvieron en PBS estéril a 4°C hasta la obtención de las células epiteliales. Estas células se recolectaron en flujo laminar perfundiendo los oviductos con PBS estéril atemperado a 38,5°C y presionando mecánicamente con pinzas finas.

Las células epiteliales obtenidas fueron lavadas con PBS estéril mediante 2 centrifugaciones a 1500 g por 5 min cada vez. Posteriormente, el *pellet* fue resuspendido en medio de cultivo estéril a 38,5°C y colocado en placas de cultivo. Las placas conteniendo a las células permanecieron en estufa por 48 h a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub> para permitir la formación de las vesículas de células oviductales.

Una vez transcurrido este tiempo, las vesículas oviductales fueron removidas de la placa y centrifugadas a 1500 g por 5 min. El *pellet* obtenido fue resuspendido y colocado nuevamente en las placas de cultivo a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo fue renovado cada 48 h hasta la formación de una monocapa confluyente de CEO (este proceso llevó de 10 a 14 días).

## **3. Medición de NAEs**

Estas mediciones fueron realizadas en el laboratorio del Dr. Justin Konje (Universidad de Leicester, Reino Unido) en el marco de una pasantía de investigación.

### **3.1. Recolección de las muestras**

Como se ha descrito en el punto 1.3.4, los oviductos provenientes del matadero se clasificaron en 4 estadios correspondientes a los distintos momentos del ciclo estral bovino



(Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio)). Además, los oviductos fueron separados de acuerdo a su posición respecto al sitio de la ovulación o el folículo dominante en ipsilateral (oviducto del lado de la ovulación) o contralateral (del lado contrario a la ovulación). Una vez clasificados, los oviductos fueron cuidadosamente separados de los tejidos circundantes, se aislaron la ampolla y el istmo, y se recolectó el contenido oviductal junto con las CEO mediante presión con pinzas.

Las CEO fueron separadas del fluido oviductal mediante centrifugación a 300 g por 5 min, y los sobrenadantes correspondientes al fluido oviductal (entre 10 y 40  $\mu$ l) fueron inmediatamente procesados para la determinación de NAEs, mientras que las CEO fueron colocadas en freezer (-80°C) hasta su posterior procesamiento.

Además, se obtuvo mediante aspiración con jeringas, fluido folicular de folículos ovulatorios (de más de 1 cm de diámetro) presentes en los ovarios.

### ***3.2. Extracción de NAEs***

#### Fluido oviductal

A fin de determinar la eficiencia de la extracción de NAEs, se adicionaron al fluido oviductal recolectado estándares internos (2,5 pmol/ml de AEA-d8 y de OEA-d2; 5 pmol/ml de PEA-d4) en una proporción 1:1 (v/v) y se llevó a un volumen final de 50  $\mu$ l con acetonitrilo. Las muestras fueron agitadas y colocadas por 10 min a -20°C para precipitar las proteínas. Luego, fueron centrifugadas a 3000 g por 1 min a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a viales hasta su posterior medición por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa/masa (UPLC-MS/MS) tal como fue descrito por Lam y col. (2008).

#### CEO

Las CEO de la ampolla y del istmo se resuspendieron en 500 o 200  $\mu$ l de buffer de lisado respectivamente. Luego de ser sonicadas durante 30 seg, se adicionaron los estándares internos (2,5 pmol/ml de AEA-d8 y de OEA-d2; 5 pmol/ml de PEA-d4), se agitaron y centrifugaron a 15000 g por 5 min a 4°C. Los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a viales de centelleo de 7 ml Kimble (Kinesis, St. Neots, Cambs, UK) hasta la posterior extracción de NAEs.

#### Fluido folicular

Para la extracción de NAEs del fluido folicular se tomaron 500  $\mu$ l del mismo y se le adicionaron los estándares internos (2,5 pmol/ml de AEA-d8 y de OEA-d2; 5 pmol/ml de PEA-d4), se agitó vigorosamente y se llevó a un volumen final de 1 ml con agua deionizada.

Tanto para las CEO como para el fluido folicular la posterior extracción de NAEs se llevó a cabo utilizando el método en fase sólida descrito por (Marczylo y col., 2009). Para ello se utilizaron columnas de fase reversa Oasis HLB de 1 cm<sup>3</sup> conectadas a una bomba de vacío. Previo al pasaje de las muestras, las columnas fueron equilibradas con 1 ml de metanol 100% y lavadas con 1 ml de agua deionizada. Luego, las muestras fueron pasadas por las columnas. Finalmente las NAEs fueron recolectadas eluyendo con 1 ml de acetonitrilo. Las eluciones fueron evaporadas en atmósfera de nitrógeno gaseoso a 40°C. Las muestras fueron reconstituidas en 80 µl de acetonitrilo, transferidas a viales y analizadas por UPLC-MS/MS.

### ***3.3. Determinación de NAEs***

La determinación de NAEs se realizó mediante el método de UPLC-MS/MS como fue descrito por Lam y col. (2010). El sistema UPLC-MS/MS comprende un cromatógrafo líquido de alta resolución (UPLC) acoplado a un espectrómetro de masa en tándem. La columna de UPLC utilizada fue BEH C<sub>18</sub> (2,1 x 50 mm, tamaño de partícula de 1,7 µm y diámetro de poro de 130Å) la cual se mantuvo a 40°C. Las fases móviles fueron A (2 mM de acetato de amonio conteniendo 5% (v/v) de acetonitrilo y 0,1% (v/v) de ácido fórmico) y B (acetonitrilo conteniendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico). Se realizaron curvas de calibración con AEA, OEA y PEA junto con sus estándares internos.

Los picos obtenidos fueron procesados con el programa Masslynx versión 4.1.

## **4. RT-PCR**

Se llevaron a cabo estudios de RT-PCR para analizar la expresión del ARNm de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en CEO provenientes de oviductos clasificados según el estadio del ciclo estral y en CEO provenientes de cultivos celulares que fueron tratados con hormonas (E o P) durante 2 h.

### ***4.1. Extracción de ARN***

La extracción de ARN total se realizó con TRIZOL según las indicaciones del fabricante. La cuantificación de ARN total se realizó en nanodrop midiendo la absorbancia a 260 nm.

### ***4.2. Preparado de ADNc***

El ARN (1 µg) de cada muestra fue tratado con DNAasa. Para obtener la primer cadena de ADNc se realizó una transcripción reversa utilizando la enzima M-MLVRT (Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase) y random primers, en presencia de un inhibidor recombinante de ribonucleasas.

### 4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se utilizaron cebadores específicos diseñados con el programa Prime-BLAST sobre la base de la secuencia de ADNc de *Bos taurus*:

NAPE-PLD:	<b>5'</b> AGATTTGGCCCTTTTGACCT <b>3'</b> (sentido)
	<b>5'</b> CTTACACAGTTTCGCTGGA <b>3'</b> (antisentido)
FAAH:	<b>5'</b> CTGCCAAGCAACATACCTCA <b>3'</b> (sentido)
	<b>5'</b> GGCTGATAACCTTGGGAACA <b>3'</b> (antisentido)
Actina:	<b>5'</b> AGGCGGACTGTTAGCTGCGTT <b>3'</b> (sentido)
	<b>5'</b> TGCTCGATCCAACCGACTGCT <b>3'</b> (antisentido)

La reacción de PCR fue llevada a cabo utilizando como molde los ADNc previamente obtenidos por transcripción reversa, junto con desoxiribonucleótidos trifosfato, Taq DNA polimerasa (2,5 unidades), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM) y los cebadores previamente mencionados (0,5 μM).

Las condiciones adecuadas de hibridación y extensión fueron puestas a punto para cada reacción:

- **NAPE-PLD:** 94°C 5 min (desnaturalización inicial) y 35 ciclos de 94°C 40 seg, 54°C 40 seg, 72°C 40 seg. El producto posee una longitud de 202 pb.
- **FAAH y actina:** 94°C 5 min (desnaturalización inicial) y 35 ciclos 94°C 40 seg, 55°C 40 seg, 72°C 40 seg. Los productos poseen una longitud de 204 y 182 pb respectivamente

### 4.4. Detección de la amplificación

Los productos que resultaron de la amplificación fueron sembrados en un gel de agarosa 2% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (0,5 μg/ml), y separados mediante una corrida electroforética a 100 V. Una vez finalizada la corrida electroforética, las bandas fueron visualizadas mediante el uso de un transiluminador y los geles se fotografiaron con cámara digital bajo luz UV. La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH) y las bandas correspondientes a cada ARNm se normalizaron respecto a la banda correspondiente a actina de la misma muestra. Los pesos moleculares de las bandas fueron determinados de acuerdo a los pesos moleculares de los marcadores utilizados.

## 5. Western blot

Mediante esta técnica se estudió la expresión de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en CEO de oviductos que habían sido clasificados de acuerdo al estadio del ciclo estral (ver apartado 1.3.4). Además se analizó la expresión de NAPE-PLD y FAAH en espermatozoides criopreservados y en CEO provenientes de cultivos primarios.

Esta técnica también se utilizó para determinar la fosforilación en residuos tirosina de los espermatozoides luego de realizar los experimentos de capacitación espermática *in vitro* (apartado 10).

### 5.1. Procesamiento de las muestras

Los espermatozoides criopreservados y las CEO fueron procesados tal como se ha descrito en el apartado 1.3.3. Luego de la centrifugación, los *pellets* que contenían los espermatozoides o las CEO fueron resuspendidos en buffer de lisis conteniendo detergentes e inhibidores de proteasas. Posteriormente, cada muestra fue sonicada 2 veces por 30 seg, y las muestras de CEO fueron centrifugadas por 10 min a 14000 g. Las proteínas contenidas en los sobrenadantes fueron cuantificadas mediante el método de Bradford (1976).

Las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su utilización.

### 5.2. Separación electroforética de las muestras

La separación electroforética de las muestras se realizó según la técnica descrita por Laemmli (1970). Las proteínas extraídas fueron colocadas en buffer muestra, calentadas en baño térmico a 100°C durante 5 min y sembradas en geles de poliacrilamida 10% (p/v) conteniendo SDS (SDS-PAGE). La corrida electroforética se realizó bajo condiciones de corriente constante (15 mA por gel) a temperatura ambiente (TA) durante 90 min.

En todos los geles realizados, una de las calles correspondió a una mezcla de proteínas marcadoras de peso molecular relativo para SDS-PAGE (estándar de PM, Full Range Rainbow Recombinant (Amersham)).

### 5.3. Electrotransferencia de proteínas

En el caso de las enzimas NAPE-PLD y FAAH, una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (0,45  $\mu$ m), utilizando el sistema de transferencia húmedo (Mini-Protean III, Bio Rad). La transferencia se realizó durante 18 h a 4°C a voltaje constante (30 V).

A fin de determinar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas fueron incubadas durante 1 min a TA con una solución del colorante reversible Rojo Ponceau S.

Posteriormente, la membrana de nitrocelulosa fue lavada exhaustivamente con solución de lavado T-PBS.

En el caso de proteínas fosforiladas en residuos tirosina, una vez finalizada la electroforesis, las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF previamente activada con metanol, utilizando el sistema de transferencia húmedo mencionado previamente. La transferencia se realizó durante 6 h a 4°C a voltaje constante (30 V).

#### **5.4. Inmunodetección y revelado**

Las membranas fueron incubadas con solución de bloqueo durante 1 h a TA. Luego del bloqueo, las mismas fueron incubadas durante 18 h a 4 °C con el primer anticuerpo específico para la proteína de interés (Tabla 6).

<b>Proteína</b>	<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Tipo de anticuerpo</b>
NAPE-PLD	1:2500	Policlonal
FAAH	1:500	Policlonal
Tirosinas fosforiladas	1:2000	Monoclonal
Actina	1:4000	Policlonal
Tubulina	1:5000	Monoclonal

**Tabla 6:** Concentración y tipos de anticuerpos primarios utilizados en los Western blots.

Una vez finalizada la incubación con el primer anticuerpo, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 min con T-PBS (para NAPE-PLD, FAAH y actina) o T-TBS (para tirosinas fosforiladas y tubulina) e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente: Anti IgG de conejo (1:10000) para los anticuerpos primarios policlonales y Anti IgG de ratón (1:15000) para los anticuerpos primarios monoclonales durante 1 h a TA.

El revelado se hizo mediante la técnica de quimioluminiscencia (ECL, por su denominación en inglés). Para ello, las membranas fueron incubadas con la solución de revelado para ECL (ver apartado 1.2) durante 1 min y posteriormente fueron visualizadas y fotografiadas en el analizador de imágenes ImageQuant (GE Healthcare Life Sciences).

#### **5.5. Identificación de las bandas proteicas**

Las bandas proteicas y sus correspondientes pesos moleculares se determinaron a partir de los controles positivos (proteínas extraídas de placenta humana) y los marcadores de pesos moleculares utilizados. Se verificó su peso molecular por su valor de relación de frente ( $R_f$ :

cociente entre la distancia recorrida por la proteína y la distancia recorrida por el frente) aplicando una regresión logarítmica.

La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa Image J (NIH) y las bandas correspondientes a cada proteína se normalizaron respecto a la banda de actina de la misma calle. Los datos se expresaron como densidad óptica (DO) relativa a la actina.

## **6. Inmunocitoquímica**

Se realizaron estudios de inmunocitoquímica a fin de determinar la localización de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en espermatozoides, CEO y cortes de oviducto bovino.

### ***6.1. Fijación de las muestras***

Los espermatozoides fueron fijados con paraformaldehído (PF) 0,2% (p/v) en PBS durante 5 min a 4°C y luego lavados por centrifugación tres veces por 5 min a 800 g. Se contó el número de espermatozoides presentes en el *pellet*, utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración final de  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml con PBS. Finalmente, se colocó 1 gota (25  $\mu$ l) de esta suspensión de espermatozoides en un portaobjetos y se dejó secar a TA.

Las monocapas de CEO (ver apartado 2) fueron fijadas con PF 0,2% durante 5 min a 4°C, y lavadas con PBS tres veces durante 5 min.

Por otro lado, los oviductos en distintos estadios del ciclo estral (ver apartado 1.3.4) fueron fijados en PF 4% 18 h a 4°C, deshidratados en gradiente creciente de alcoholes e incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos de los oviductos los cuales fueron montados en portaobjetos y guardados hasta su utilización.

### ***6.2. Inmunodetección***

#### ***6.3. En preparados de espermatozoides***

Los espermatozoides fueron permeabilizados con metanol 100% durante 5 min a -20°C y lavados 3 veces con PBS por 5 min cada vez. Los preparados fueron incubados con una solución de bloqueo conteniendo BSA 40 mg/ml en PBS durante 1 h a TA. Posteriormente, éstos fueron incubados con el primer anticuerpo de NAPE-PLD (1:1500), o con el primer anticuerpo de FAAH (1:500) durante 18 h a 4°C. Como control negativo se omitió la incubación con el primer anticuerpo o se realizó la incubación con suero normal del animal en el que fue hecho el primer anticuerpo (isotipo) a la misma concentración proteica que la presentada en el anticuerpo.

Una vez finalizada la incubación, los espermatozoides fueron lavados 3 veces con T-PBS durante 5 min. Luego las células fueron incubadas con el segundo anticuerpo Alexa Fluor 555 (1:1000) para el caso de NAPE-PLD y Alexa Fluor 488 (1:1000) para el caso de FAAH durante 1 h a TA. Una vez lavadas con PBS las muestras espermáticas fueron montadas con líquido de montaje.

Los preparados se observaron al microscopio de fluorescencia o confocal y las fotos fueron tomadas con cámara digital acoplada al mismo.

#### ***6.4. En preparados de CEO***

Las CEO fueron permeabilizadas con metanol 100% durante 10 min a -20°C y lavadas 3 veces con PBS por 5 min cada vez. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando con una solución de bloqueo conteniendo BSA 40 mg/ml en PBS durante 2 h a TA. Posteriormente, las CEO fueron incubadas con el primer anticuerpo anti NAPE-PLD (1:1500) o anti FAAH (1:150) durante 18 h a 4°C. En este caso también se realizó la incubación con el isotipo como control negativo.

Luego de la incubación con el primer anticuerpo las células fueron lavadas con PBS e incubadas con el segundo anticuerpo Alexa Fluor 555 (1:1000) para el caso de NAPE-PLD y Alexa Fluor 488 (1:1000) para el caso de FAAH durante 1 h a TA. Luego de 3 lavados con PBS, las CEO fueron montadas con líquido de montaje.

Los preparados se observaron al microscopio de fluorescencia y se tomaron fotografías con cámara digital acoplada al mismo.

#### ***6.5. En cortes de oviducto bovino***

Los cortes fueron desparafinados y rehidratados en gradiente decreciente de alcoholes. Se incubó con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% (v/v) en H<sub>2</sub>O a durante 10 min a fin de suprimir la actividad endógena de peroxidasa. Los cortes histológicos fueron incubados con solución de bloqueo (suero normal de conejo) durante 20 min a TA. Se descartó el exceso de solución y se adicionó el primer anticuerpo: de FAAH (1:100) y NAPE-PLD (1:1000) 18 h a 4°C. Los cortes fueron lavados en T-TBS por 20 min y luego se colocó el anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min a TA. Luego fueron lavados con T-TBS por 20 min y se adicionó la solución ABC Elite (Vectastain, Vector Laboratories, Reino Unido) durante 30 min a TA. Posteriormente los preparados fueron lavados con T-TBS y se adicionó la solución que contenía diaminobenzidina durante 5 min a TA. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>O.

Se realizó una contra-coloración con hematoxilina durante 8 seg. Se deshidrató y se montó con líquido de montaje DPX. Como control negativo, los cortes se incubaron con PBS sin anticuerpo primario o con el isotipo correspondiente a cada anticuerpo primario (IgG).



Los preparados se observaron al microscopio óptico y se tomaron fotografías con cámara digital acoplada al mismo.

## 7. Actividad de la enzima hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH)

Se determinó la actividad de FAAH en CEO provenientes de oviductos en distintos estadios del ciclo estral (ver apartado 1.3.4) según la técnica descrita por (Paria y col., 1996).

Luego de ser recolectadas, las CEO de la ampolla o del istmo oviductal fueron centrifugadas a 1000 g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. El *pellet* conteniendo las CEO fue resuspendido en 100  $\mu$ l de buffer de homogeneización de AEA. Las muestras fueron sonicadas 2 veces por 30 seg y las proteínas cuantificadas mediante el método de Bradford (1976).

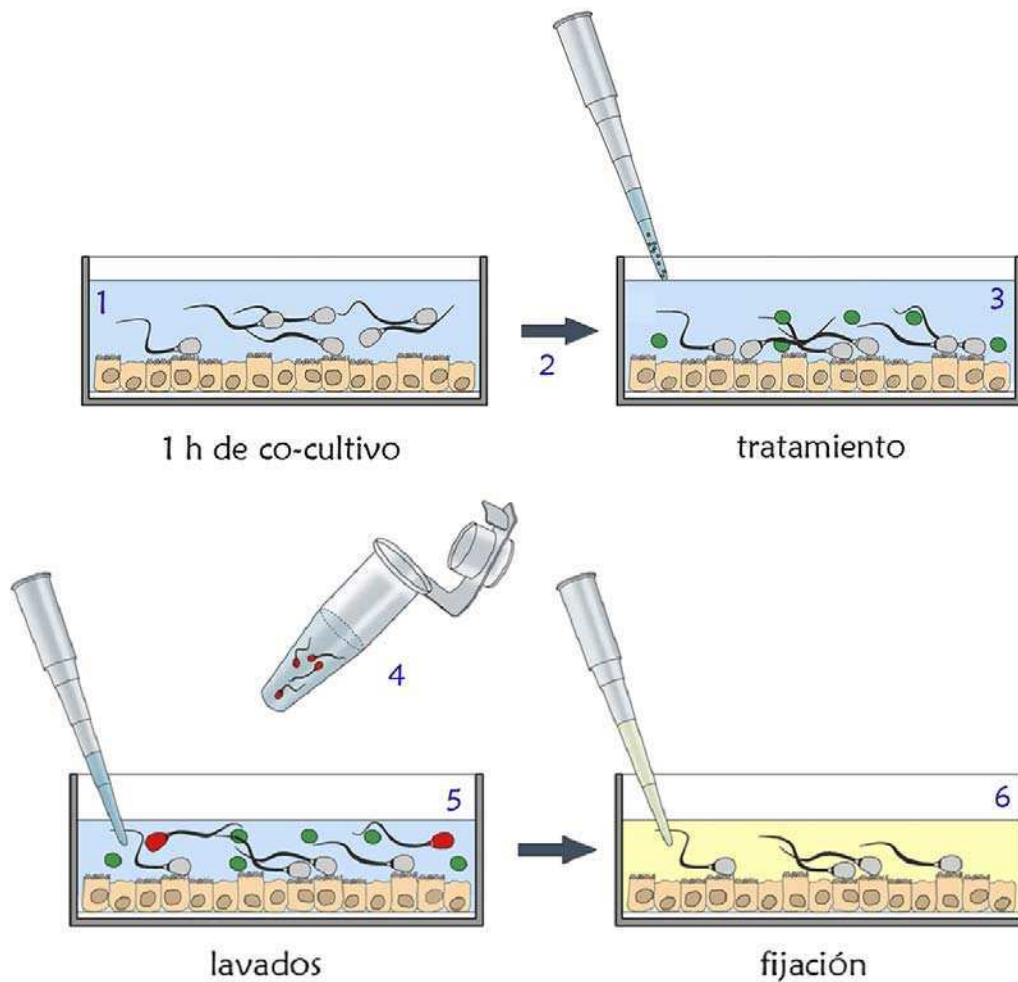
Se incubaron 30  $\mu$ g de proteínas durante 30 min a 37°C en 200  $\mu$ l de buffer FAAH que contenía [ $^3$ H]-AEA (100  $\mu$ M) y 20 nmoles de AEA fría. La reacción se detuvo colocando las muestras en hielo y adicionando una solución de cloroformo:metanol (1:1 v/v). Se centrifugó 5 min a 7000 g y se transfirió la fase orgánica a otro tubo. Sobre la fase acuosa restante se realizaron 2 extracciones de componentes orgánicos adicionando cloroformo y centrifugando 5 min a 7000 g. Las fases orgánicas de cada muestra se recolectaron en el mismo tubo y se dejó evaporar el solvente. Una vez secas, las muestras se resuspendieron en cloroformo y se sembraron en placas de cromatografía de capa delgada (TLC) sílica gel junto con los estándares de AEA y AA (ácido araquidónico). Las placas se corrieron en la fase orgánica de un sistema de solventes compuesto por acetato de etilo:hexano:ácido acético:agua destilada (100:50:20:100 v/v). Los lípidos fueron visualizados por tinción con yodo, identificados por la migración conjunta con los estándares. Las calles de cada muestra conteniendo a los lípidos separados cromatográficamente, fueron cortadas en secciones dependiendo de la localización de los lípidos de interés y fueron colocadas en viales de centelleo. La cuantificación se realizó en un contador de centelleo líquido. La actividad del pico radioactivo correspondiente al AA fue contada y expresada como un porcentaje de la radioactividad total de cada calle. La actividad enzimática se expresó como nmol AA/h/mg de proteína.

## 8. Co-cultivos

La participación de las hormonas ováricas (E y P) o de distintos endocannabinoides en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino se estudió mediante un modelo de co-cultivo de espermatozoides-CEO desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Figura 14).



Previo a realizarse el co-cultivo, las CEO fueron estabilizadas entre 1 y 3 h en sp-TALPm a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Si bien el diseño experimental fue similar en todos los casos, hubo diferencias en los tiempos de incubación entre los distintos tratamientos.



**Figura 14.** Diseño experimental de co-cultivos espermatozoides-CEO. **1)** Los ESP fueron co-incubados con las CEO durante 1 h. **2)** Se realizaron 3 lavados con sp-TALPm. **3)** Tratamiento con los distintos fármacos utilizados. **4)** Los ESP liberados fueron recolectados para su posterior análisis. **5)** Se realizaron 3 lavados con sp-TALPm. **6)** Los co-cultivos fueron fijados con glutaraldehído 0,1% (v/v) durante 1 h.

### ***8.1. Diseño experimental para el estudio de la participación de las hormonas ováricas y los endocannabinoides en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino***

#### ***8.2. Hormonas ováricas***

En este caso los espermatozoides fueron co-incubados durante 1 h con las CEO en medio sp-TALPm en una concentración final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego de lavar 3 veces con 0,5 ml de sp-TALPm para descartar aquellos espermatozoides que no estuvieran unidos a las CEO, los co-cultivos fueron incubados durante 1, 2 ó 4 h con E (10 pg/ml), P (10 ng/ml) o ambos en estufa a 38,5°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las concentraciones de hormonas ováricas utilizadas se corresponden con las medidas en el oviducto bovino al momento peri-ovulatorio para el caso de la P y las medidas en suero al momento peri-ovulatorio para el caso del E (Wijayagunawardane y col., 1998; Odau y col., 2006).

Por otro lado se realizaron co-cultivos que fueron incubados durante 2 h con las hormonas ováricas en conjunto con antagonistas selectivos de los receptores de cannabinoides CB1 (SR141716A; Ant-CB1; 0,1 nM) y con antagonistas selectivos de los receptores de vanilloides TRPV1 (capsazepina; Ant-TRPV1; 0,1  $\mu$ M). Como control se realizaron co-cultivos provenientes del mismo conjunto de oviductos incubados con sp-TALPm solo.

En todos los casos, luego de las incubaciones se realizaron 3 lavados con sp-TALPm y se fijó con glutaraldehído (0,1% v/v) durante 1 h a TA. Luego, los co-cultivos se montaron en portaobjetos con líquido de montaje y se contó el número de espermatozoides unidos a las CEO en 20 campos mediante el uso de una grilla acoplada al ocular de un microscopio óptico de contraste de fase. Los resultados se expresaron como n° de espermatozoides unidos a las CEO por unidad de área.

#### ***8.3. Endocannabinoides***

Los espermatozoides fueron co-incubados durante 1 h con las CEO en medio sp-TALPm a una concentración final de  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego del lavado para descartar los espermatozoides que no se unieron a las CEO, los co-cultivos fueron incubados con diferentes agonistas y antagonistas (de los receptores CB1 y TRPV1) así como también con inhibidores (de las enzimas PLC y FAAH) o activadores (de la enzima PLC) durante 15 min:

- 1) sp-TALPm (control)

- 2) Agonista específico de TRPV1 (capsaicina; 0,1  $\mu$ M)
- 3) Agonista específico de CB1 (ACEA; 50 nM)
- 4) Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 5) Capsaicina (0,1  $\mu$ M) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 6) Capsaicina (0,1  $\mu$ M) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 7) Met-AEA (Agonista cannabinoide no hidrolizable; 1,4 nM)
- 8) Met-AEA (1,4 nM) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 9) Met-AEA (1,4 nM) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 10) Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 11) Inhibidor de FAAH (URB597; 0,5 nM; 5nM; 50 nM)
- 12) URB597 (5 nM) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 13) URB597 (5 nM) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 14) URB597 (5 nM) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 15) U73122 (Inhibidor de PLC; 10  $\mu$ M)
- 16) m-3M3FBS (Activador de PLC; 20  $\mu$ M)

Al finalizar los 15 min de co-incubación con los fármacos, los co-cultivos fueron lavados 3 veces con sp-TALPm y posteriormente fijados, montados y analizados del mismo modo descrito en el punto anterior (ver 8.1.1).

#### ***8.4. Diseño experimental para el estudio de la participación del $\text{Ca}^{2+}$ en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino***

A fin de determinar la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de acción de AEA en la liberación, se realizaron co-cultivos espermatozoides-CEO con espermatozoides preincubados con BAPTA-AM, un quelante intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . El procedimiento realizado se describe a continuación: luego de ser descongelados y seleccionados por lana de vidrio (ver apartado 1.3.3) los espermatozoides fueron incubados con BAPTA-AM (5  $\mu$ M) o medio sp-TALPm (control) durante 45 min en estufa a 38,5°C con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de la incubación, los espermatozoides fueron lavados con medio sp-TALPm atemperado y centrifugados durante 5 min a 800 g. El *pellet* de espermatozoides fue resuspendido en medio sp-TALPm y los espermatozoides fueron incubados con las CEO en una concentración de  $0,5 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Luego de 1 h de incubación, los co-cultivos fueron lavados con sp-TALPm e incubados con los distintos tratamientos durante 15 min:

- 1) sp-TALPm (control)
- 2) AEA (1 nM)

- 3) Met-AEA (1,4 nM)
- 4) Capsaicina (0,1  $\mu$ M)

Al finalizar los 15 min de co-incubación con los fármacos, los co-cultivos fueron lavados 3 veces con sp-TALPm y posteriormente fijados, montados y contados como ha sido descrito previamente (ver apartado 8.1.1).

## **9. Determinación del calcio intracelular ( $\text{Ca}^{2+}_i$ )**

Estos experimentos fueron realizados en el laboratorio del Dr. Manuel Villalón (Universidad Católica de Chile, Chile) en el marco de una pasantía de investigación.

La determinación del  $\text{Ca}^{2+}_i$  se realizó en espermatozoides unidos a las CEO. Para ello, los espermatozoides fueron preincubados con FURA2-AM (2,5  $\mu$ M) por 40 min en estufa a 38,5°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Estos fueron lavados por centrifugación y colocados en co-cultivo con las CEO durante 1 h. Luego de 3 lavados con sp-TALPm, los co-cultivos fueron colocados en el mismo medio y se adquirieron imágenes fluorescentes (F=340/380 nm) seriadas de los espermatozoides con un microscopio acoplado a un sistema de adquisición de imágenes digitales (Metafluor, Universal Imaging Corporation, v6.1). Las imágenes fueron adquiridas cada 3 seg en medio sp-TALPm (basal) durante 2 min y luego de la adición de distintos fármacos cada 3 seg durante 5 min. Los tratamientos que se realizaron se enumeran a continuación:

- 1) sp-TALPm (control)
- 2) AEA (1 nM)
- 3) AEA (1 nM) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 4) AEA (1 nM) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 5) Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 6) Ant-CB1 (0,1 nM)
- 7) Capsaicina (0,1  $\mu$ M)
- 8) URB597 (5 nM)

Al finalizar la incubación, los co-cultivos fueron incubados con ionomicina (10  $\mu$ M), como control de viabilidad de los espermatozoides.

Los datos se analizaron con el programa Metamorph (Universal Imaging Corporation, v6.1) y los cambios en la fluorescencia asociados a los cambios en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  se

expresaron como la diferencia del área bajo la curva (ABC) obtenida durante los 5 min de tratamiento y el ABC obtenido durante los 2 min basales.

El número de réplicas y de espermatozoides (ESP) analizados fue distinto para cada tratamiento:

Control: n=11, nº ESP analizados=106; AEA: n=15, nº ESP analizados=135; AEA + Ant-TRPV1: n= 7, nº ESP analizados=78; AEA + Ant-CB1: n=11, nº ESP analizados=104; Ant-TRPV1: n=4, nº ESP analizados=45; Ant-CB1: n=3, nº ESP analizados=29; capsaicina: n=11, nº ESP analizados=86; URB597: n=5, nº ESP analizados=32.

Además, a fin de determinar la posible participación del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular se realizaron experimentos de determinación de  $\text{Ca}^{2+}$  con AEA (1 nM) o capsaicina (0,1  $\mu\text{M}$ ) en presencia de lantano ( $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ;1 mM) ya que éste actúa como un bloqueador inespecífico de canales de cationes.

En este caso el número de réplicas y de ESP analizados fue distinto para cada tratamiento: Control: n=11, nº ESP analizados=106; AEA: n=15, nº ESP analizados=135; capsaicina: n=11, nº ESP analizados=86; AEA +  $\text{La}^{3+}$ : n=3, nº ESP analizados=8; capsaicina +  $\text{La}^{3+}$ : n=3, nº ESP analizados=20.

## 10. Capacitación espermática

Los espermatozoides fueron descongelados y seleccionados tal como se mencionó en el apartado 1.3.3. Posteriormente las células (10-15 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/ml) fueron incubadas en medio sp-TALP o con distintos tratamientos durante 45 min a 38,5°C.

Debido a que durante la capacitación espermática los espermatozoides sufren una gran variedad de modificaciones a nivel bioquímico y estructural, existen diversas metodologías para la determinación experimental del nivel de capacitación de los mismos. En el presente trabajo se abordaron 3 de ellas: determinación del patrón B por la técnica de CTC; inducción de la reacción acrosomal con LPC (lisofosfatidilcolina) evaluado con *Pisum sativum*-FITC y mediante el análisis del grado de fosforilación en residuos tirosina de las proteínas espermáticas por Western blot (ver apartado 5).

### 10.1. Evaluación de la capacitación por CTC

El CTC es un antibiótico fluorescente que se une al  $\text{Ca}^{2+}$  que se encuentra asociado a los fosfolípidos de la membrana plasmática (Hallett y col., 1972). La técnica se basa en la formación de complejos CTC- $\text{Ca}^{2+}$  unido a fosfolípidos de membrana que cambian el patrón de fluorescencia del espermatozoide de acuerdo a las modificaciones que se dan en la

membrana plasmática durante la capacitación. Esta técnica permite identificar 3 patrones de los espermatozoides: intacto, capacitado y reaccionado. Un espermatozoide intacto presenta fluorescencia uniforme en toda la cabeza (Patrón F); un espermatozoide capacitado presenta fluorescencia solamente en la región acrosomal (Patrón B) y un espermatozoide reaccionado presenta fluorescencia en la zona ecuatorial o simplemente carece de fluorescencia (Patrón AR).

Para evaluar la capacitación espermática mediante esta técnica, se tomó una alícuota de los espermatozoides incubados con los siguientes tratamientos:

- 1) sp-TALP solo (control)
- 2) Met-AEA (a) 0,14 nM; (b) 1,4 nM; (c) 14 nM; (d) 0,14  $\mu$ M y (e) 1,4  $\mu$ M)
- 3) AEA (1 nM)
- 4) Heparina (60  $\mu$ g/ $\mu$ l)
- 5) Met-AEA (1,4 nM) + Ant-CB1 (0,1 nM)
- 6) Met-AEA (1,4 nM) + Ant-CB2 (0,1 nM)
- 7) Met-AEA (1,4 nM) + Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M)
- 8) URB597 (5 nM)

Cada alícuota fue colocada junto con el diluyente de CTC en proporción 1:1 (v/v) durante 30 seg. A continuación los espermatozoides fueron fijados con glutaraldehído 0,2% (v/v) en PBS en proporción 1:1 (v/v).

Se determinó el estado de capacitación de al menos 200 espermatozoides por tratamiento bajo un microscopio de fluorescencia. Los resultados fueron expresados como porcentaje de espermatozoides que presentaron el patrón B de CTC.

## **10.2. Inducción de la reacción acrosomal con LPC**

Esta técnica se basa en que únicamente un espermatozoide capacitado desencadena la reacción acrosomal frente a un inductor de la misma. El LPC es un inductor farmacológico de la reacción acrosomal en bovinos y por lo tanto esta técnica ha sido descrita como un indicador de capacitación espermática en esta especie (Parrish y col., 1988).

Para evaluar la capacitación espermática mediante esta técnica, se tomó una alícuota de los espermatozoides incubados con los siguientes tratamientos:

- 1) sp-TALP solo (control)
- 2) Met-AEA 1,4 nM
- 3) AEA (1 nM)
- 4) Heparina (60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

Luego de 45 minutos de incubación en sp-TALP y los diferentes tratamientos, la suspensión de espermatozoides fue dividida en 2 poblaciones: a una de ellas se le adicionó LPC (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y a la otra medio sp-TALP durante 15 min en estufa a 38,5°C. Seguidamente se adicionó Hoechst 33258 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a todas las muestras durante 5 min en estufa a 38,5°C a fin de evaluar la viabilidad de los espermatozoides.

Los espermatozoides fueron fijados con PF 1% (p/v) durante 10 min a TA, lavados con PBS y sembrados en portaobjetos a una concentración de 50-100x10<sup>5</sup> espermatozoides/gota. Finalmente los mismos fueron permeabilizados con metanol 100% durante 10 min a TA y luego incubados con la lectina PSA-FITC (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 1 h a TA. Al finalizar la incubación las células fueron lavadas 3 veces con PBS y montadas con glicerol:PBS (9:1, v/v). Se contabilizó el nº de espermatozoides vivos con acrosoma intacto y vivos reaccionados de todas las muestras (aproximadamente 200 espermatozoides/tratamiento) en un microscopio de fluorescencia. El porcentaje de capacitación se expresó como la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides vivos que sufren la reacción acrosomal en presencia de LPC y el porcentaje de espermatozoides vivos reaccionados espontáneamente (sin LPC).

### **10.3. Fosforilación en residuos tirosina**

La capacitación espermática está asociada con un aumento en la fosforilación en residuos tirosina de las proteínas espermáticas, por ello es posible relacionar el estado de capacitación de los espermatozoides de acuerdo al patrón de fosforilación en residuos tirosina mediante la técnica de Western blot (Visconti y col., 1995a).

Para evaluar la capacitación espermática mediante esta técnica, se tomó una alícuota de los espermatozoides incubados con los siguientes tratamientos:

- 1) sp-TALP solo (control)
- 2) Met-AEA 1,4 nM
- 3) AEA (1 nM)
- 4) Heparina (60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )

Una vez finalizada la incubación, los espermatozoides fueron centrifugados a 800 g durante 5 min y el *pellet* obtenido fue resuspendido en buffer de siembra hasta obtener una concentración de  $25 \times 10^6$  espermatozoides/ml.

Las muestras fueron sembradas en geles de poliacrilamida de 10% ( $1 \times 10^6$  espermatozoides/calle), separadas electroforéticamente, transferidas y reveladas con anticuerpo anti fosfotirosina tal como se especifica en el apartado 5.

## **11. Análisis de la función espermática**

Se evaluó la funcionalidad espermática de los espermatozoides liberados de las CEO con AEA (1 nM) (ver apartado 8.1.2). Para ello, se midieron distintos parámetros indicadores del estado funcional del espermatozoides tales como: viabilidad, motilidad, integridad del acrosoma y estado de capacitación.

Los espermatozoides liberados con AEA o sp-TALPm (control), en los experimentos de liberación antes descritos, fueron procesados para el análisis de los distintos parámetros espermáticos según la técnica correspondiente en cada caso.

### **11.1. Motilidad**

El análisis de la motilidad progresiva (MP) de los espermatozoides determina el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento progresivo desde una posición de origen. Se evaluó la MP de los espermatozoides liberados mediante observación directa bajo microscopio óptico invertido. Los resultados se expresaron como porcentaje de espermatozoides que presentaron MP.

### **11.2. Viabilidad**

La viabilidad de los espermatozoides se determinó mediante la incubación con el fluoróforo Hoechst 33258 según fue descrito por Pintado y col. (2000). Esta técnica permite diferenciar los espermatozoides vivos de aquellos muertos ya que únicamente las células muertas (que poseen la membrana plasmática dañada) son permeables al fluoróforo y por lo tanto son aquellos que presentan marca fluorescente.

Los espermatozoides liberados en los experimentos de co-cultivo fueron recolectados e incubados durante 5 min con Hoechst 33258 ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) en estufa a  $38,5^\circ\text{C}$ . Luego las células fueron fijadas con PF 1% (p/v) durante 10 min a TA, lavadas con PBS y montadas en portaobjetos. Finalmente se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos respecto al total (aproximadamente 100 por tratamiento) en un microscopio de fluorescencia.



### **11.3. Integridad del acrosoma**

El estado acrosomal de los espermatozoides fue evaluado mediante la técnica de aglutinina *Pisum sativum* conjugada con isotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC). El PSA es una lectina que une moléculas de manosa presentes en el acrosoma de los espermatozoides y por lo tanto aquellos que presentan patrón de fluorescencia en todo el acrosoma son considerados intactos, y los que presentan fluorescencia en la zona del segmento ecuatorial de la cabeza o no presentan fluorescencia son considerados reaccionados.

Los espermatozoides liberados en los experimentos de co-cultivo fueron recolectados y fijados con PF 1% (p/v) durante 10 min a TA, lavados por centrifugación a 800 g con PBS y colocados en portaobjetos. Las células fueron permeabilizadas durante 5 min con metanol a -20°C y, una vez lavados con PBS, se incubaron durante 1 h a TA con 10 (µg/ml) de PSA-FITC.

Al finalizar la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS y montadas con Glicerol:PBS (9:1, v/v). Los preparados fueron observados en un microscopio de fluorescencia y se determinó el porcentaje de espermatozoides con acrosoma intacto respecto a los espermatozoides totales observados (aproximadamente 100 por tratamiento).

### **11.4. Estado de capacitación**

El estado de capacitación de los espermatozoides liberados fue determinado mediante la técnica de CTC descrita en el apartado 10.1.

## **12. Análisis estadístico de los datos**

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con el programa Infostat versión 2011 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

Los datos se expresaron como los valores medios  $\pm$  EE (error estándar de la media).

Los datos de las mediciones de NAEs obtenidos en fluido oviductal fueron analizados mediante una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores fijos, siendo éstos el lado del oviducto y el estadio del ciclo estral.

Los datos de las mediciones de NAEs obtenidos en CEO fueron analizados mediante una prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores fijos, siendo éstos el lado del oviducto, la región del oviducto y el estadio del ciclo estral.

Los análisis de correlación entre NAEs se realizaron mediante correlaciones de spearman, considerándose significativas aquellas con un  $p < 0,05$ .

Los datos de los experimentos de co-cultivo fueron analizados mediante una prueba de ANOVA en bloque, habiéndose considerado un bloque a cada pool de CEO-espermatozoides.

Los experimentos de co-cultivo con BAPTA-AM fueron sometidos a una prueba de ANOVA de 2 factores fijos, considerándose a los tratamientos como un factor y al BAPTA-AM como otro factor.

Los datos de los experimentos de medición de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular fueron analizados mediante una prueba de ANOVA anidado, considerándose al factor espermatozoides anidado a la placa.

En análisis de los datos de los experimentos restantes se realizó mediante un ANOVA de un factor.

En todos los casos, cuando la prueba resultó significativa ( $p < 0,05$ ) se realizaron contrastes *a posteriori* aplicando los test de Tukey o Fisher. Se consideró que existían diferencias significativas entre los tratamientos cuando el p resultante fue menor a 0,05.

Para todas las series de datos analizadas fueron probadas la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, y la normalidad mediante la prueba de Cochran y Bartlett. Las series de datos que no cumplían con los supuestos fueron modificadas con las transformaciones apropiadas a cada caso.

## 1. Estudio de los niveles de endocannabinoides en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.

Como se ha mencionado en la introducción, los endocannabinoides tales como la AEA, y NAEs relacionadas como la OEA y la PEA están presentes en el tracto reproductor femenino de varios mamíferos incluyendo a los humanos.

En el presente trabajo se midieron los niveles de estos tres compuestos tanto en el fluido oviductal como en las CEO en bovinos en los distintos estadios del ciclo estral y en las distintas regiones del oviducto. Debido a que la AEA es uno de los endocannabinoides que participa en la interacción de los espermatozoides con las CEO, también se caracterizó la expresión y localización en el oviducto de las principales enzimas del metabolismo de la AEA mediante las técnicas de RT-PCR, Western blot e inmunohistoquímica.

### 1.1. Medida de los niveles de NAEs en el fluido oviductal bovino a lo largo del ciclo estral.

Los niveles de AEA, OEA y PEA fueron medidos mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa/masa (UPLC-MS/MS), en el fluido proveniente de oviductos clasificados según su estadio del ciclo estral y su ubicación respecto al lado correspondiente a la ovulación (ipsilateral o contralateral).

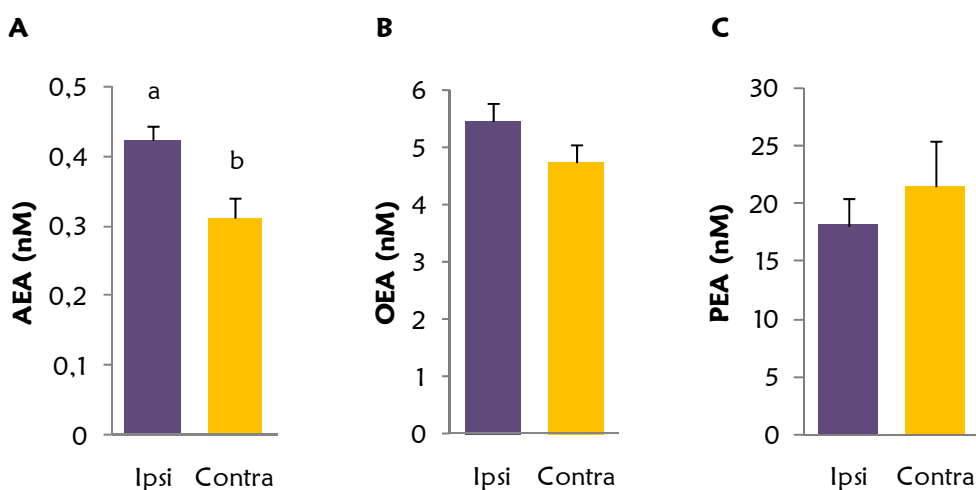
Estadio	Ipsilateral				Contralateral			
	AEA (nM)	OEA (nM)	PEA (nM)	N	AEA (nM)	OEA (nM)	PEA (nM)	n
I	0,46 ± 0,12	6,62 ± 0,72	19,37 ± 6,32	6	0,29 ± 0,07	5,04 ± 0,65	31,53 ± 15,5	5
II	0,41 ± 0,05	4,7 ± 0,63	21,64 ± 8,19	12	0,27 ± 0,04	3,38 ± 0,41	11,74 ± 2,53	9
III	0,37 ± 0,06	5,47 ± 0,46	11,54 ± 2,05	14	0,3 ± 0,04	4,59 ± 0,34	22,41 ± 9	14
IV	0,45 ± 0,13	5,09 ± 0,66	21,67 ± 7,64	6	0,39 ± 0,11	5,89 ± 0,91	19,8 ± 3,8	6

**Tabla 7.** Medida de los niveles de distintas NAEs en el fluido oviductal bovino separado en ipsilateral y contralateral al sitio de ovulación en los distintos estadios del ciclo estral. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio).  $p > 0,05$ .

En la Tabla 7 se observa que la concentración de AEA en el fluido oviductal bovino es del orden nanomolar y la misma fluctúa entre los distintos estadios del ciclo estral. Es interesante destacar que los mayores niveles de este endocannabinoide se encontraron en los estadios

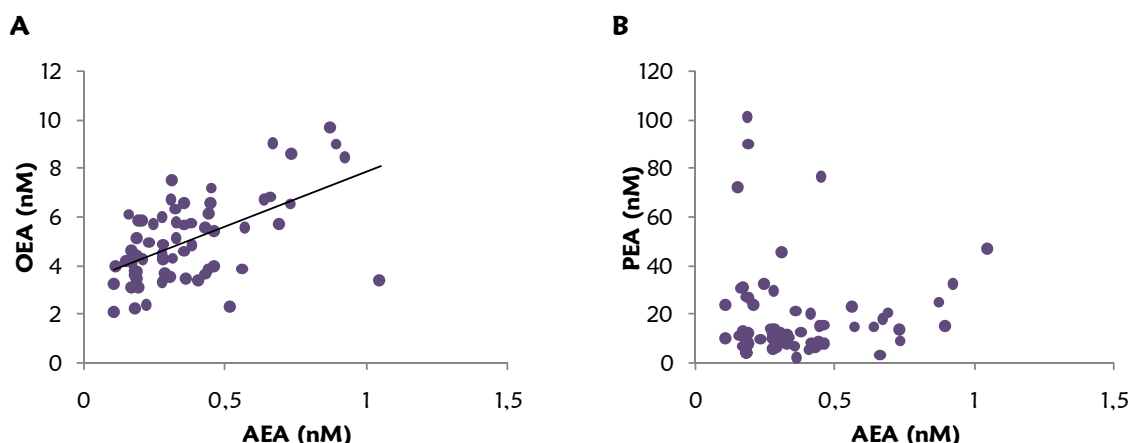
correspondientes al momento peri-ovulatorio (I y IV). Además, si bien las concentraciones de OEA y PEA determinadas en dicho fluido también son del orden nanomolar, las mismas son entre 15 y 40 veces mayores a las de AEA, respectivamente.

Varios componentes del fluido oviductal difieren en la concentración entre el oviducto ipsilateral y contralateral, por lo tanto además se analizaron los datos según el lado respecto al sitio de la ovulación. En este caso se observó que la concentración de AEA es mayor en el fluido oviductal proveniente del lado ipsilateral respecto al del lado contralateral (Figura 15 A; AEA ipsilateral:  $0,42 \pm 0,02$  nM; AEA contralateral:  $0,31 \pm 0,03$  nM;  $p < 0,05$ ). En cambio, las concentraciones de OEA y PEA no presentaron diferencias significativas entre ambos lados (Figuras 15 B y C).



**Figura 15.** Medida de los niveles de NAEs en el fluido oviductal bovino clasificado en ipsilateral (Ipsi) y contralateral (Contra). **A)** Niveles de AEA oviductal,  $n(\text{Ipsi}) = 38$ ,  $n(\text{Contra}) = 34$ ;  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ . **B)** Niveles de OEA oviductal,  $n(\text{Ipsi}) = 33$ ,  $n(\text{Contra}) = 30$ . **C)** Niveles de PEA oviductal,  $n(\text{Ipsi}) = 35$ ,  $n(\text{Contra}) = 29$ .

Asimismo el análisis de los datos de las distintas NAEs medidas en el fluido oviductal indicó que existe una correlación positiva entre la concentración de AEA y de OEA en el oviducto bovino (Figura 16 A), mientras que no existe correlación entre AEA y PEA (Figura 16 B).



**Figura 16.** Correlación entre las distintas NAEs en el fluido oviductal bovino. **A)** Correlación positiva entre AEA y OEA,  $n=63$ ; coeficiente de correlación de Spearman=0,53;  $p<0,001$ . **B)** Ausencia de correlación entre AEA y PEA,  $n=64$ ;  $p=0,83$ .

### **1.2. Medida de los niveles de NAEs en células epiteliales del oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.**

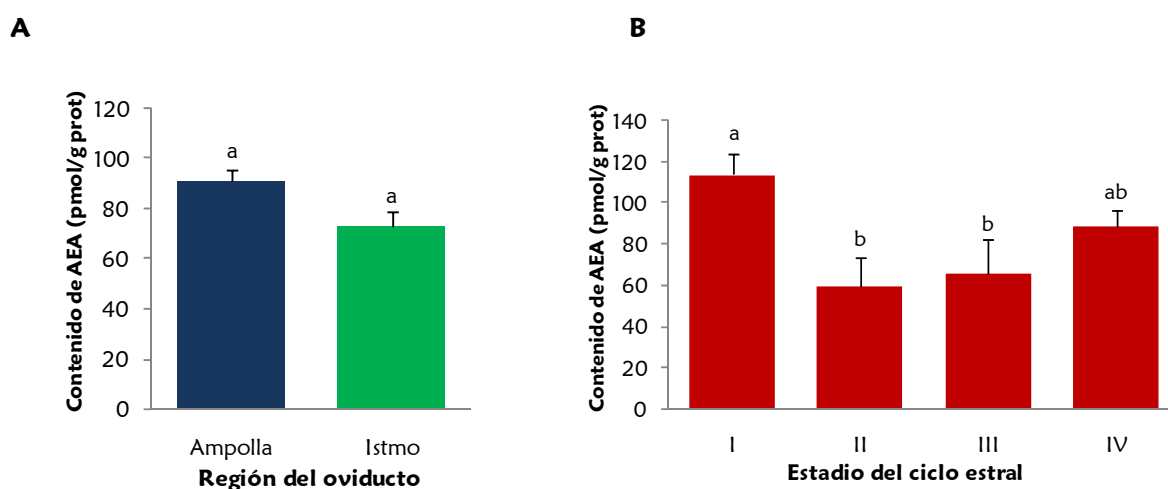
Luego de determinar la concentración de endocannabinoides en el fluido oviductal, se midieron los niveles de AEA, OEA y PEA intracelular en células epiteliales obtenidas de oviductos clasificados según el lado respecto a la ovulación, la región del oviducto (ampolla o istmo), y el estadio del ciclo estral.

En contraste con lo hallado en el fluido oviductal, no se encontraron diferencias significativas en los niveles intracelulares de AEA en las CEO entre el lado ipsilateral o contralateral a la ovulación (Tabla 8). En la tabla 8 se muestra que tampoco hubo diferencias significativas en los niveles intracelulares de OEA aunque sí se observaron diferencias en los niveles de PEA entre ambos lados del oviducto.

	Ipsilateral	n	Contralateral	n
<b>AEA (nM)</b>	90,32 $\pm$ 9,26 a	31	73,21 $\pm$ 5,92 a	29
<b>OEA (nM)</b>	327,82 $\pm$ 31,36 a	31	287,06 $\pm$ 24,53 a	29
<b>PEA (nM)</b>	252,34 $\pm$ 27,02 a	29	198,33 $\pm$ 28,53 b	27

**Tabla 8.** Contenido intracelular de NAEs en las células epiteliales del oviducto bovino provenientes del lado ipsilateral o contralateral a la ovulación.  $a \neq b$ ,  $p<0,05$ .

Por otro lado, la evaluación de los niveles intracelulares de AEA en las dos regiones del oviducto indicó que no hay variación entre ampolla e istmo (Figura 17 A). Sin embargo, se encontraron diferencias significativas a lo largo del ciclo estral, detectándose los niveles más elevados en el estadio I que corresponde al momento post-ovulatorio (Figura 17 B).

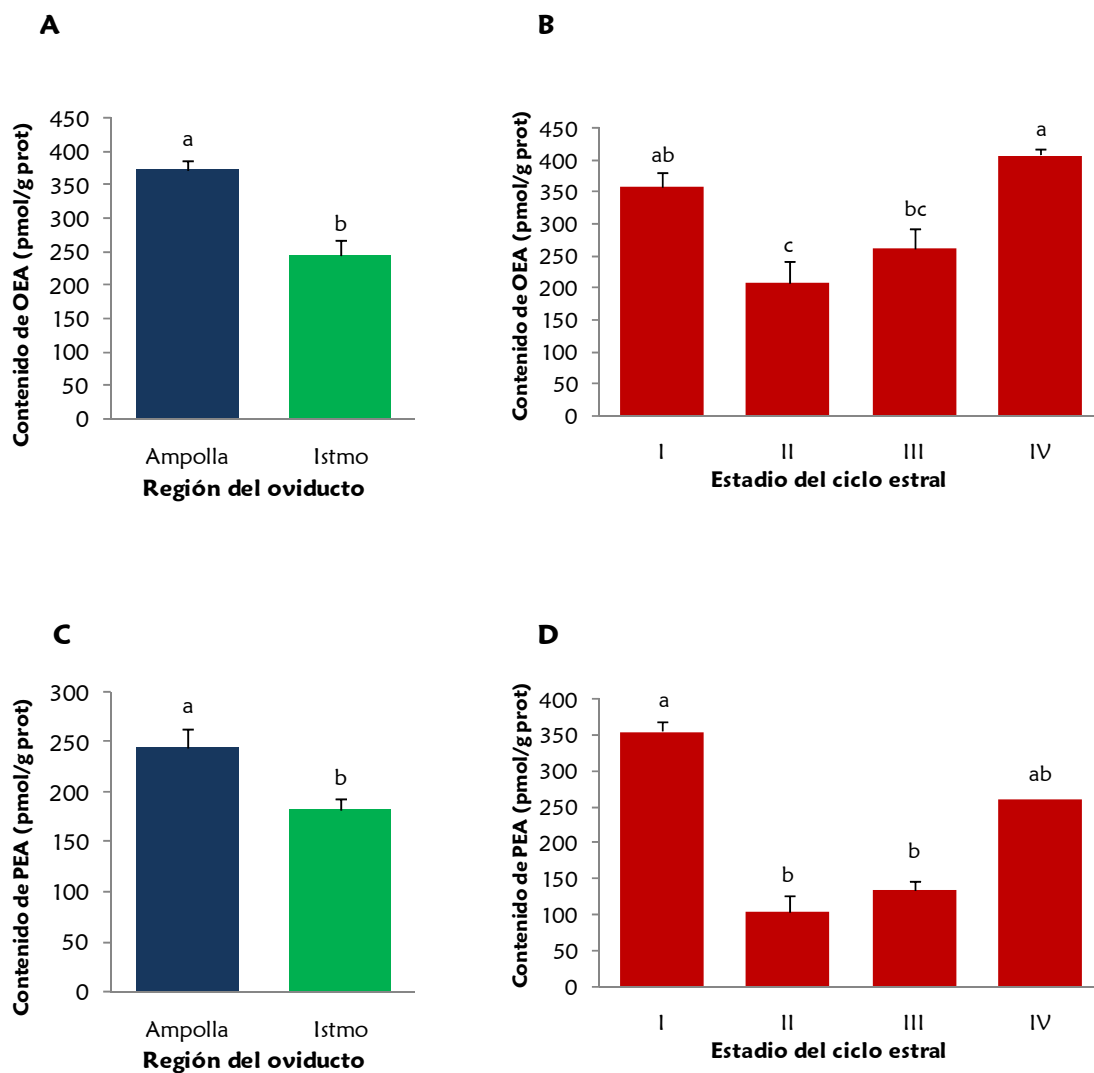


**Figura 17.** Medida del contenido de AEA intracelular en las células epiteliales del oviducto bovino.

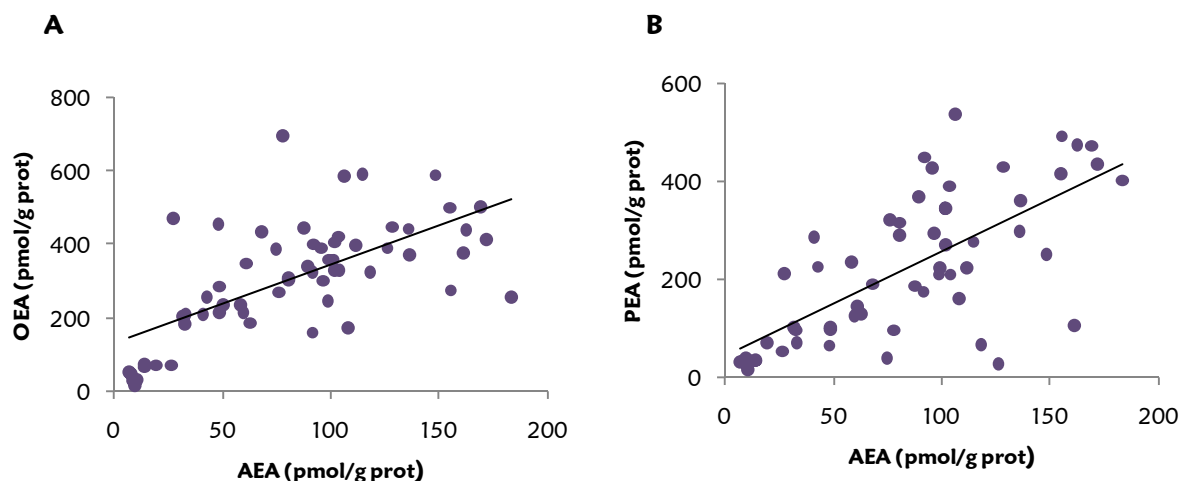
**A)** Contenido de AEA intracelular en la distintas regiones del oviducto, n=30. **B)** Contenido de AEA intracelular en los distintos estadios del ciclo estral, n=15. En todos los casos  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

Además, los niveles intracelulares de OEA y de PEA difieren significativamente entre las regiones del oviducto estudiadas, así como también entre los distintos estadios del ciclo estral (Figuras 18 A, B, C y D). En ambos casos, los niveles medidos fueron mayores en la ampolla que en el istmo y fueron elevados en los estadios peri-ovulatorios (I y IV).

Al igual que en el fluido oviductal, se analizó la posible correlación entre las distintas NAEs medidas. Los resultados indicaron que tanto los niveles intracelulares de OEA como los de PEA correlacionan positivamente con los de AEA (Figura 19).



**Figura 18.** Medida del contenido de NAEs intracelular en las células epiteliales del oviducto bovino. **A)** Contenido de OEA intracelular en la distintas regiones del oviducto, n=30. **B)** Contenido de OEA intracelular en los distintos estadios del ciclo estral, n=15. **C)** Contenido de PEA intracelular en la distintas regiones del oviducto, n=30. **D)** Contenido de OEA intracelular en los distintos estadios del ciclo estral, n=15. En todos los casos  $a \neq b \neq c$ ,  $p < 0,05$ .



**Figura 19.** Correlación entre los niveles de NAEs intracelulares en las células epiteliales del oviducto. **A)** Correlación positiva entre AEA y OEA,  $n=60$ ; coeficiente de correlación de spearman=0,66;  $p<0,001$ . **B)** Correlación positiva entre AEA y PEA,  $n=56$ ; coeficiente de correlación de spearman=0,67,  $p<0,001$ .

En conjunto estos resultados indicaban que el oviducto bovino contiene endocannabinoides y otras NAEs y que los niveles de los mismos fluctúan a lo largo del ciclo estral y según el lado del oviducto respecto al sitio de la ovulación.

### ***1.3. Expresión y localización de la enzima NAPE-PLD en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.***

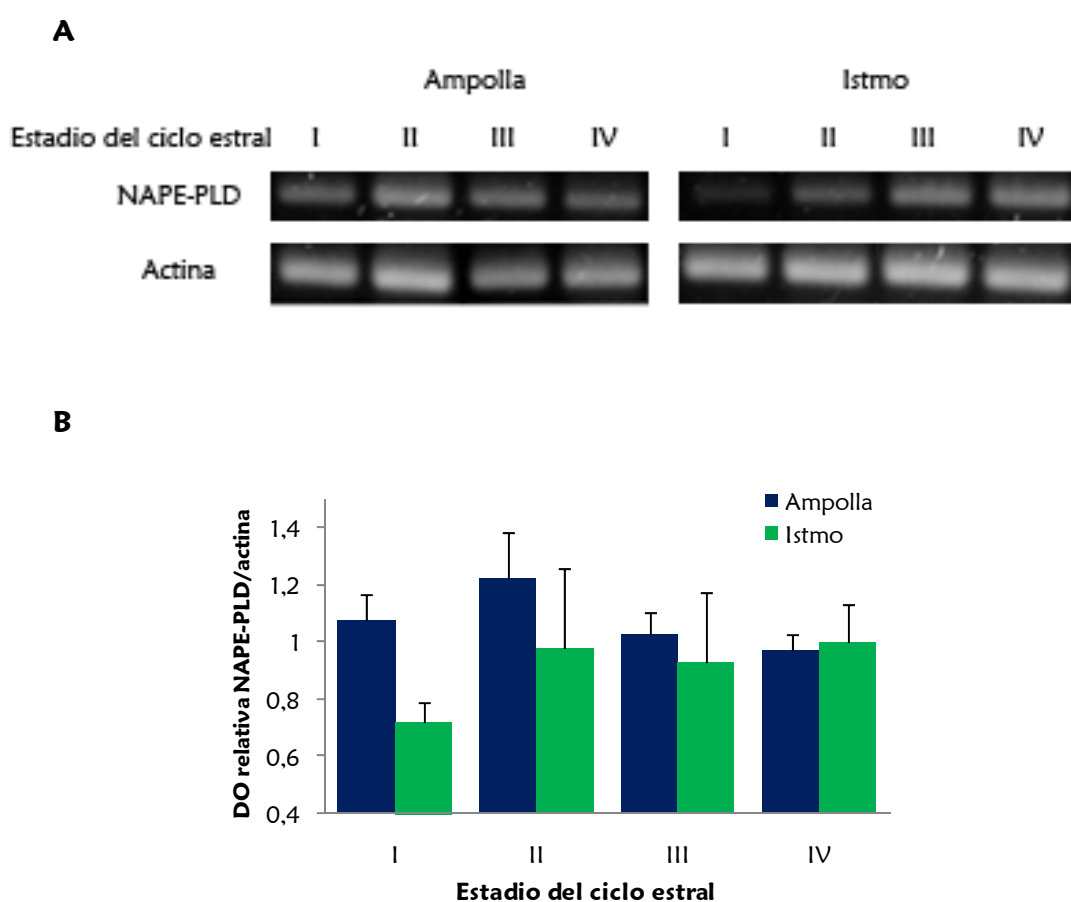
Hasta aquí encontramos que la concentración intracelular de AEA varía significativamente entre los distintos estadios del ciclo estral en las CEO bovinas, y que el contenido de AEA en el fluido del oviducto ipsilateral es mayor respecto al contralateral. Por lo tanto el siguiente paso fue evaluar la expresión y localización de las principales enzimas del metabolismo de este endocannabinoide en oviductos provenientes del lado ipsilateral a la ovulación en los distintos estadios del ciclo estral.

Como se ha mencionado en la introducción la AEA se sintetiza a través de múltiples caminos metabólicos. La principal vía de síntesis ocurre a partir del precursor de membrana NAPE y la NAPE-PLD es la enzima involucrada en este proceso. En este apartado nos interesó analizar la expresión y localización de esta enzima en CEO de la ampolla y del istmo de



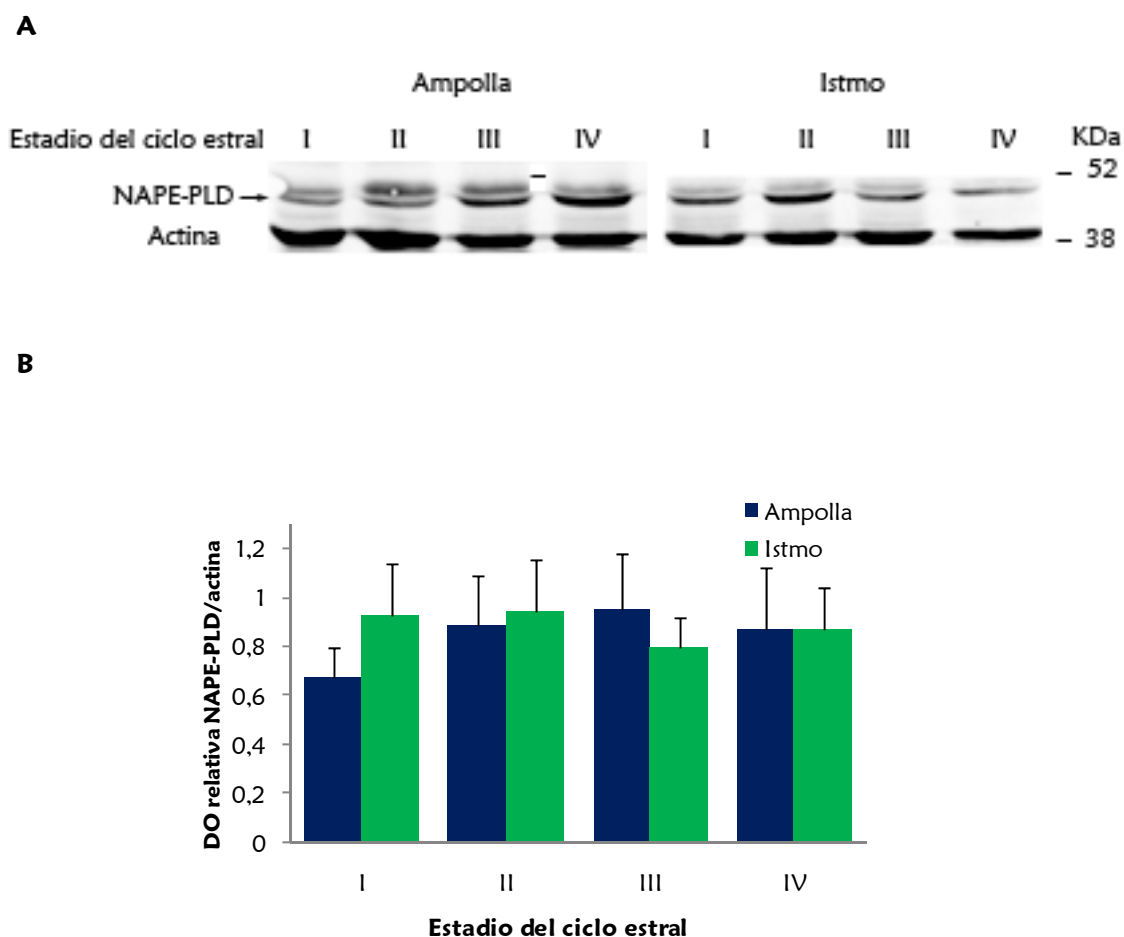
oviductos provenientes del lado ipsilateral a lo largo del ciclo estral. Para ello, se realizaron estudios de RT-PCR, Western blot e inmunohistoquímica utilizando anticuerpos específicos.

En la Figura 20 A se observa en las calles correspondientes tanto a la ampolla como al istmo la aparición de una banda de 202 pb que corresponde al ARNm de NAPE-PLD. La expresión de este mensajero fue normalizada según la expresión del ARNm de actina. El análisis de densitometría óptica de las bandas visualizadas indicó que la expresión del ARNm de NAPE-PLD no presenta diferencias significativas en los distintos estadios del ciclo estral ni en las dos regiones del oviducto evaluadas (Figura 20 B).



**Figura 20.** Expresión del ARNm de la enzima NAPE-PLD en células epiteliales de la ampolla y del istmo oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. **A)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas correspondientes al mensajero de NAPE-PLD y actina (n=6). **B)** Análisis de densitometría óptica (DO) relativa. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio).

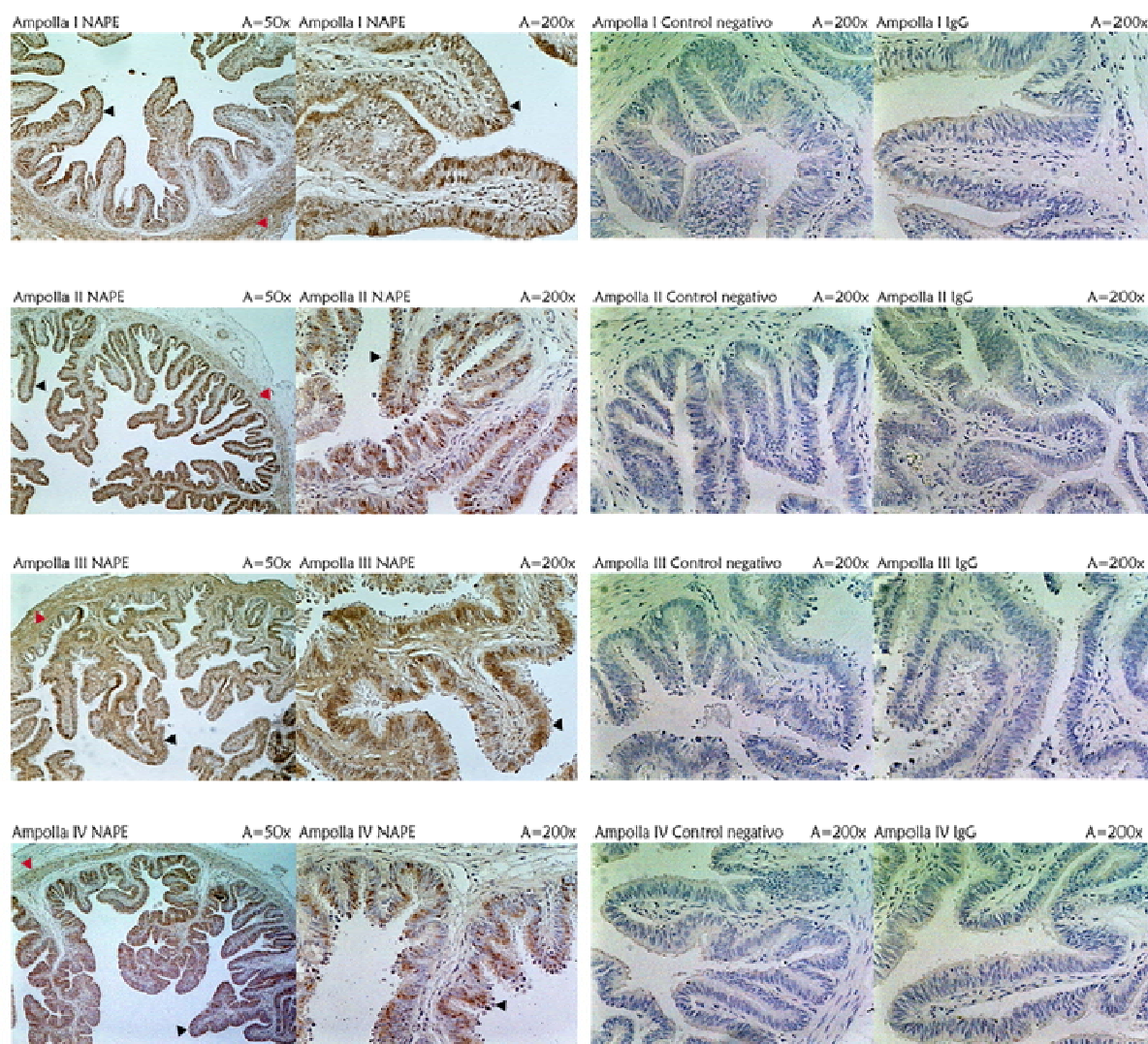
Además, se determinó la expresión de la proteína NAPE-PLD en CEO tanto de la ampolla como del istmo mediante la técnica de Western blot. La proteína fue detectada en ambas regiones del oviducto con un peso molecular relativo de 46 KDa (Figura 21 A). No se observaron variaciones significativas de la expresión proteica de NAPE-PLD en las distintas regiones ni estadios estudiados (Figura 21 B).



**Figura 21.** Expresión proteica de la enzima NAPE-PLD en células epiteliales de la ampolla y del istmo oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. **A)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas por Western blot correspondientes a la proteína de NAPE-PLD (46 KDa) y actina (42 kDa). (n=6). **B)** Análisis de densitometría óptica (DO) relativa. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio).

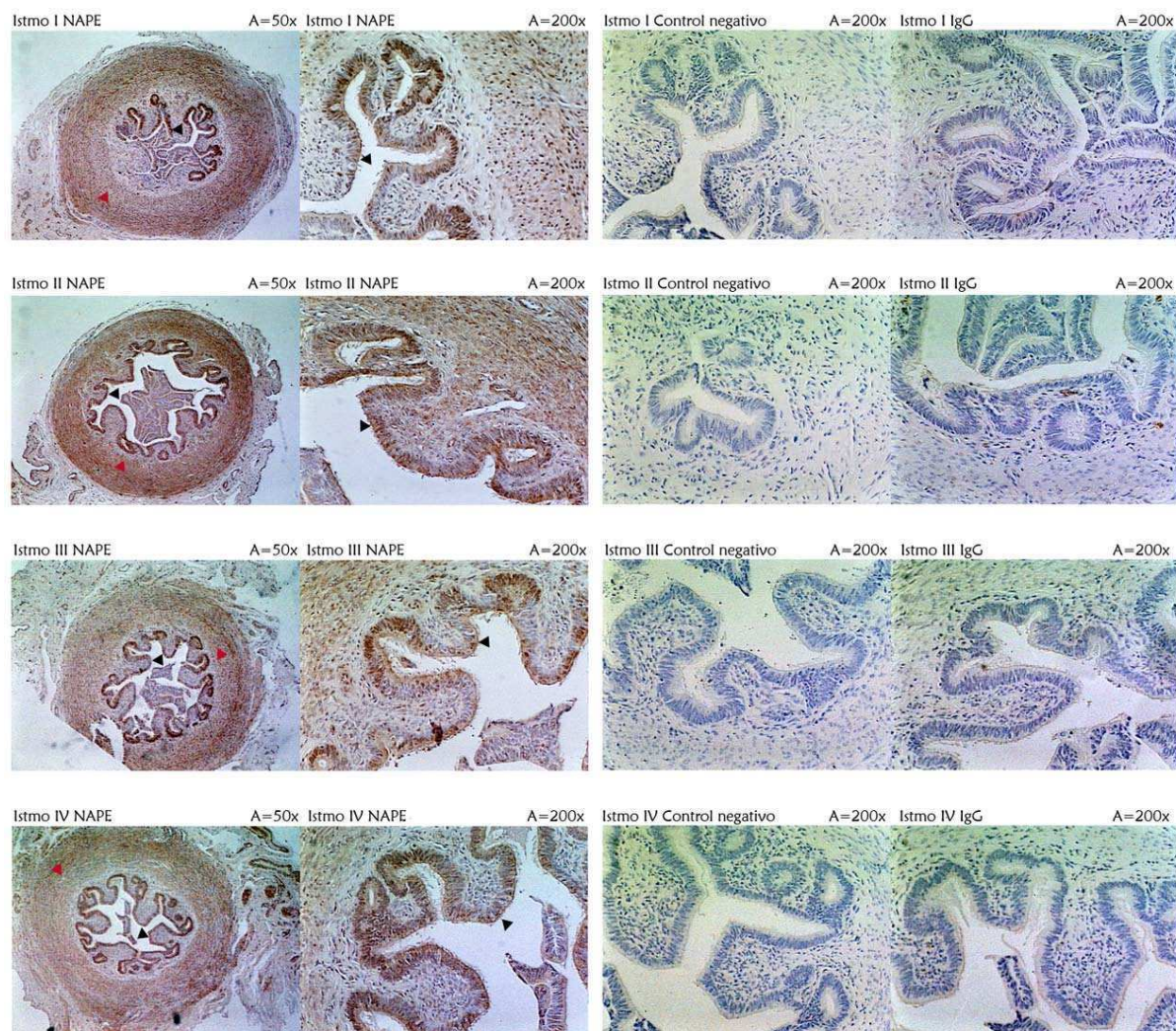
La localización de la enzima NAPE-PLD se determinó en cortes histológicos de las dos regiones del oviducto mediante inmunohistoquímica. Como resultado se obtuvo que tanto en

la ampolla como en el istmo la enzima NAPE-PLD se expresa en la capa de células epiteliales y en la capa de la musculatura circular a lo largo del ciclo estral (Figuras 22 y 23).



**Figura 22.** Localización de la proteína de la enzima NAPE-PLD (indicado como NAPE) en cortes histológicos transversales de la ampolla oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. En los paneles de la izquierda se observa la marca correspondiente a la enzima en células epiteliales del oviducto (flechas negras) y a la capa de musculatura circular del mismo (flechas rojas). En los paneles de la derecha se muestran los respectivos controles negativos (izq: sin primer anticuerpo; der: isotipo IgG de conejo). Fotos representativas de un n=3. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio). A: 50X y 200X.



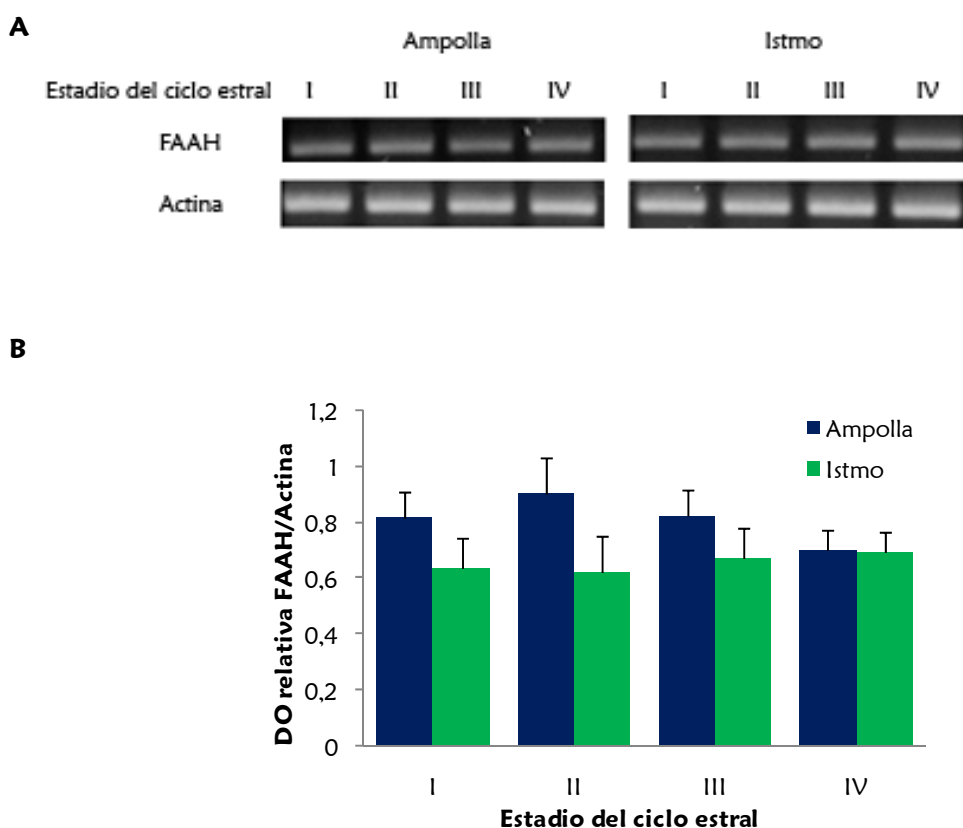


**Figura 23.** Localización de la proteína de la enzima NAPE-PLD (indicado como NAPE) en cortes histológicos transversales del istmo oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. En los paneles de la izquierda se observa la marca correspondiente a la enzima en células epiteliales del oviducto (flechas negras) y a la capa de musculatura circular del mismo (flechas rojas). En los paneles de la derecha se muestran los respectivos controles negativos (izq: sin primer anticuerpo; der: isotipo IgG de conejo). Fotos representativas de un  $n=3$ . Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio). A: 50X y 200X.

#### 1.4. Expresión y localización de la enzima FAAH en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.

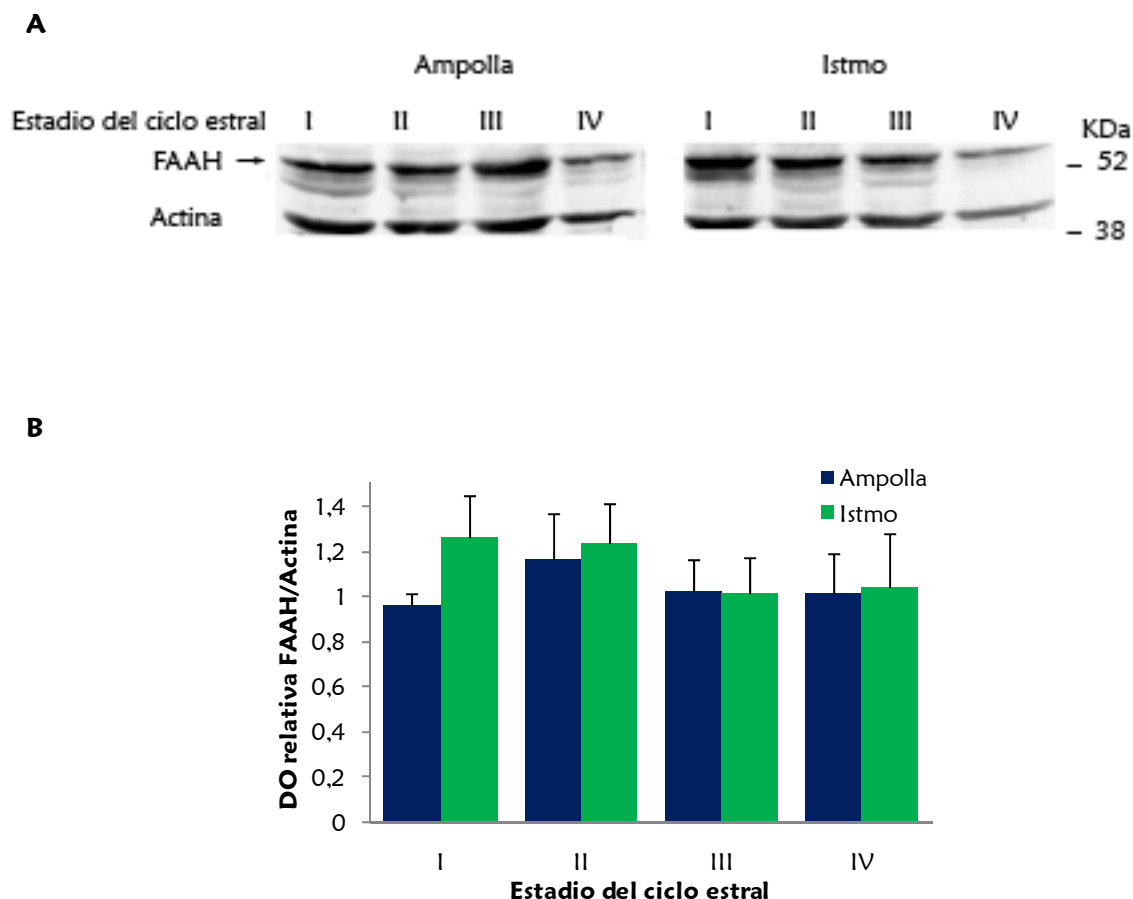
Debido a que FAAH es una de las principales enzimas que degrada AEA, se analizó la expresión y localización de la misma en CEO de la ampolla o del istmo de oviductos provenientes del lado ipsilateral.

Mediante la técnica de RT-PCR se determinó una banda de 204 pb correspondiente al mensajero de FAAH en las CEO (Figura 24 A). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la expresión del ARNm de esta enzima entre las distintas regiones del oviducto o entre los distintos estadios del ciclo estral (Figura 24 B).



**Figura 24.** Evaluación de la expresión del ARN mensajero de la enzima FAAH en células epiteliales de la ampolla y del istmo oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. **A)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas correspondientes al mensajero de FAAH y actina (n=6). **B)** Análisis de densitometría óptica (DO) relativa. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio).

Por otro lado se evaluó la expresión de la proteína de FAAH en las CEO de la ampolla y del istmo mediante la técnica de Western blot. En la Figura 25 A se observa una banda de peso molecular relativo de 58 KDa correspondiente a la proteína de esta enzima. En concordancia con los resultados previos de la expresión del mensajero, no se observó una variación significativa en la expresión proteica de FAAH entre los estadios del ciclo estral dentro de una misma región del oviducto (Figura 25 B).

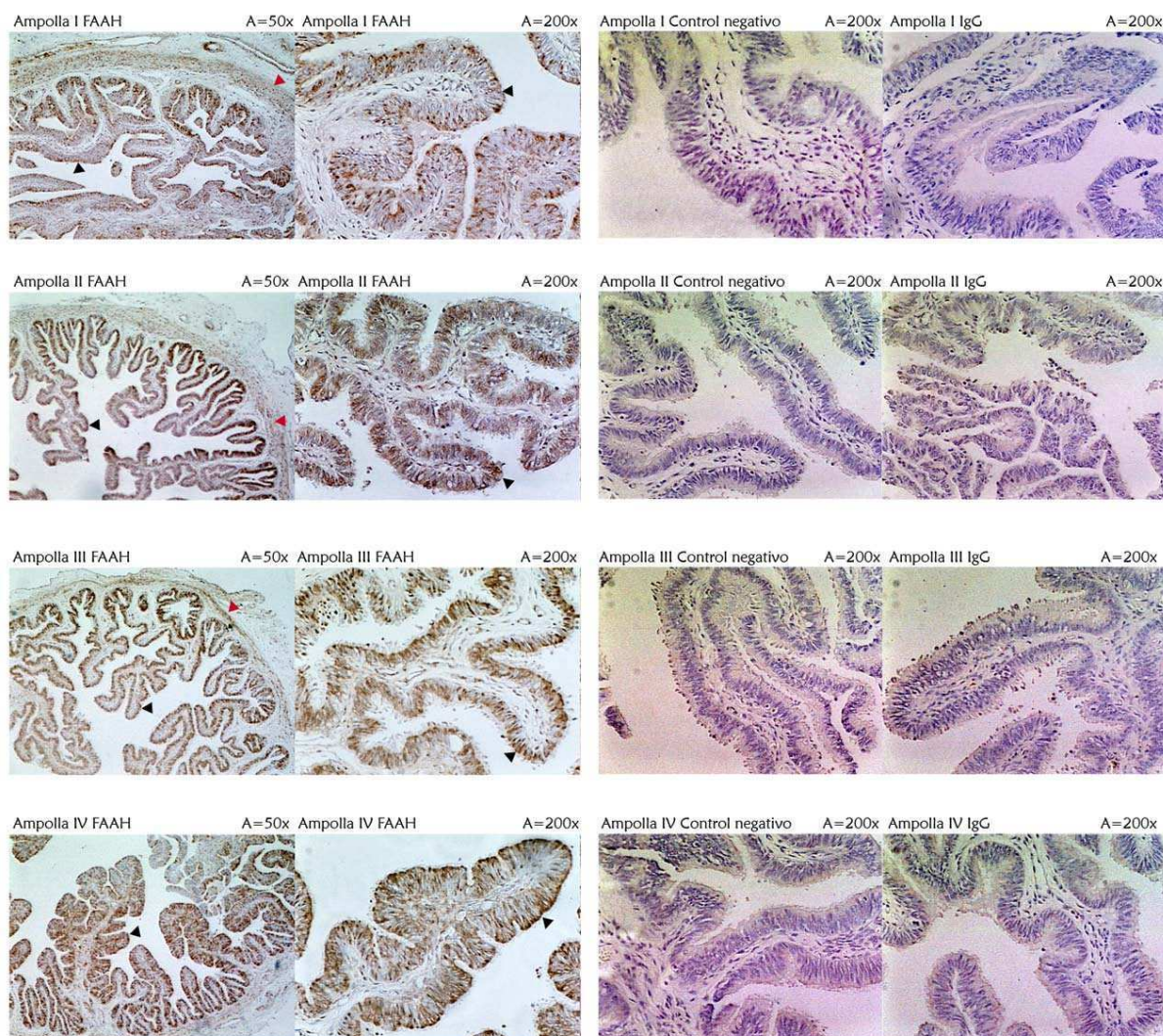


**Figura 25.** Evaluación de la expresión proteica de la enzima FAAH en células epiteliales de la ampolla y del istmo oviductal en los distintos estadios del ciclo estral mediante Western blot. **A)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas correspondientes a la proteína de FAAH (58 KDa) y actina (42 KDa) (n=6). **B)** Análisis de densitometría óptica (DO) relativa. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio).

Finalmente se determinó la localización de FAAH por inmunohistoquímica tanto en la ampolla como en el istmo en los diferentes estadios del ciclo estral. En todos los casos la

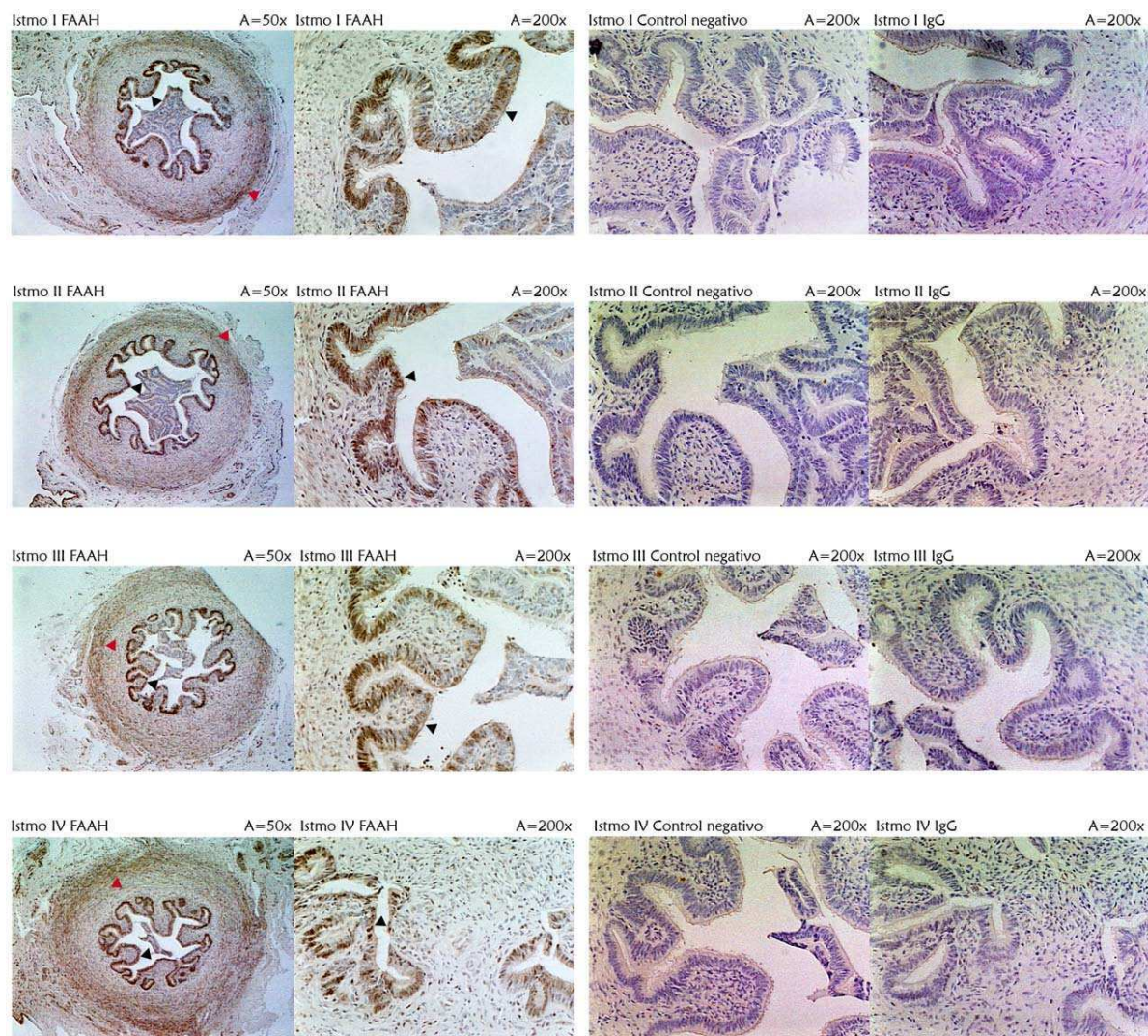


proteína se localizó principalmente en la capa de CEO y con menor intensidad en la capa de musculatura circular del mismo (Figuras 26 y 27). No se observaron diferencias en la expresión y localización entre los distintos estadios y regiones, en concordancia con los resultados obtenidos previamente mediante la técnica de Western blot.



**Figura 26.** Inmunohistoquímica de la enzima FAAH en cortes histológicos transversales de la ampolla oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. En los paneles de la izquierda se observa la marca correspondiente a la enzima principalmente en células epiteliales del oviducto (flechas negras) y en la capa de musculatura circular (flechas rojas). En los paneles de la derecha se muestran los respectivos controles negativos (izq: sin primer anticuerpo; der: isotipo IgG de conejo). Fotos representativas de un n=3. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio). A: 50X y 200X.





**Figura 27.** Inmunohistoquímica de la enzima FAAH en cortes histológicos transversales de la ampolla oviductal en los distintos estadios del ciclo estral. En los paneles de la izquierda se observa la marca correspondiente a la enzima en células epiteliales del oviducto (flechas negras) y a la capa de musculatura circular del mismo (flechas rojas). En los paneles de la derecha se muestran los respectivos controles negativos (izq: sin primer anticuerpo; der: isotipo IgG de conejo). Fotos representativas de un n=3. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio). A: 50X y 200X.



### 1.5. Medida de la actividad de la enzima FAAH en CEO bovinas a lo largo del ciclo estral.

Como se mencionó previamente, la enzima FAAH es uno de los principales puntos de regulación de los niveles de AEA. Los resultados descriptos hasta aquí, indicaron que los niveles de AEA oviductal fluctúan a lo largo del ciclo estral bovino. Teniendo en cuenta también que durante los diferentes estadios no se observaron modificaciones en la expresión de las principales enzimas de síntesis y degradación de este endocannabinoide en el oviducto bovino, el siguiente objetivo consistió en evaluar la actividad de FAAH en CEO.

La actividad de esta enzima se midió en las CEO tanto de la ampolla como del istmo ipsilateral durante los distintos estadios del ciclo estral. Los resultados se muestran en la Tabla 9, e indicaron que la actividad de la enzima FAAH no varía significativamente entre los distintos estadios y regiones del oviducto estudiadas.

Estadio	Ampolla		Contralateral	
	Actividad (nmol AA/h/mg prot)	n	Actividad (nmol AA/h/mg prot)	n
I	112,30 ± 27,96	5	104,83 ± 16,44	5
II	83,90 ± 14,58	4	71,23 ± 7,76	3
III	91,70 ± 16,14	4	95,02 ± 22,70	5
IV	89,92 ± 12,53	5	89,32 ± 16,18	5

**Tabla 9.** Medida de la actividad de la enzima FAAH en ambas regiones del oviducto (ampolla e istmo) en los distintos estadios del ciclo estral. Estadio I: días 0-5 (post-ovulatorio); estadio II: días 6-10; estadio III: días 11-17; estadio IV: días 18-20 (pre-ovulatorio);  $p > 0,05$ .

### 1.6. Medida de los niveles de AEA en el fluido folicular bovino.

En el presente trabajo los mayores niveles de AEA fueron encontrados en el estadio peri-ovulatorio del ciclo estral. Sin embargo, tanto la evaluación de la expresión de las enzimas FAAH y NAPE-PLD como la actividad de la FAAH no mostró diferencias significativas a lo largo del ciclo estral. Considerando estos hechos, el aumento de AEA oviductal en el lado ipsilateral podría estar dado por un aporte proveniente del fluido folicular que ingresa junto con el oocito en el momento de la ovulación. Por lo tanto en esta parte del trabajo se determinó la concentración de AEA en el fluido folicular de folículos ovulatorios con un diámetro igual o mayor a 1 cm. Los resultados indicaron que el fluido folicular bovino

contiene AEA y la concentración es del orden nanomolar ( $AEA = 0,97 \pm 0,06 \text{ nM}$ ;  $n = 37$ ), sugiriendo un posible aporte del fluido folicular a la concentración de AEA del oviducto ipsilateral en el momento post-ovulatorio.

## **2. Estudio de la interacción de las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.**

Las hormonas ováricas tales como el E y la P son componentes fundamentales en el control del ciclo estral en los bovinos. Previamente se ha reportado que estas hormonas regulan al sistema endocannabinoide (El-Talatini y col., 2009b, 2010; Karasu y col., 2011).

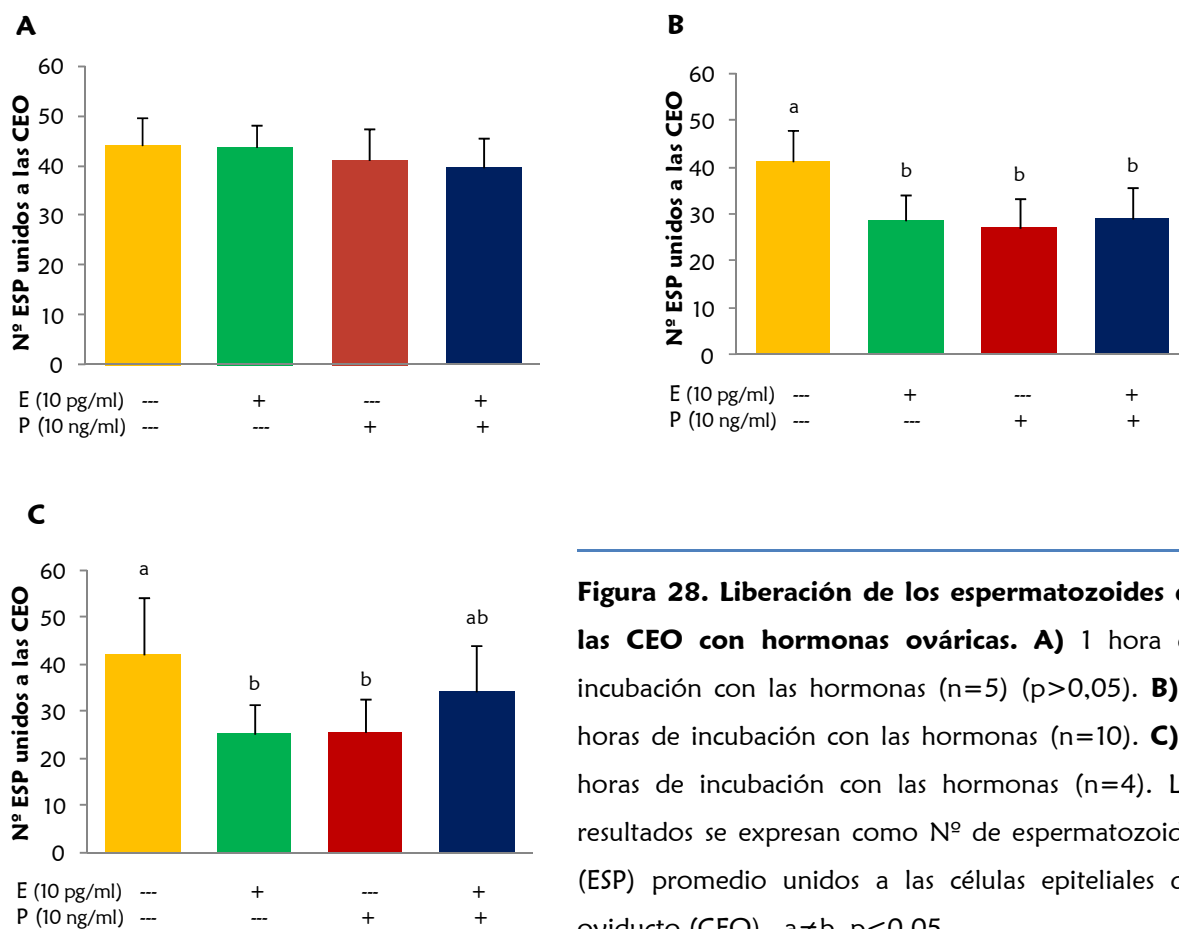
En nuestro laboratorio hemos demostrado que la AEA participa en el proceso de liberación de los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y/o TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). Estos antecedentes, junto con las evidencias encontradas en el presente trabajo que indican que el lado ipsilateral del oviducto, es decir el lado en el que se produjo la ovulación, presenta mayor concentración de AEA y que los niveles de AEA oviductal fluctúan a lo largo del ciclo estral, nos llevaron a estudiar la posible relación entre las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.

La participación del E o la P en la liberación de los espermatozoides de las CEO fue estudiada mediante un sistema de co-cultivos *in vitro* desarrollado en nuestro laboratorio (Gervasi y col., 2009).

### ***2.1. Efecto de las hormonas ováricas en la liberación de los espermatozoides de las CEO.***

A fin de estudiar si las hormonas ováricas participan en la liberación de los espermatozoides de las CEO, se realizaron experimentos de co-cultivo espermatozoides-CEO.

En primer lugar los co-cultivos fueron incubados con E (10 pg/ml), P (10 ng/ml) o la combinación de ambos durante 1, 2 o 4 h y se evaluó el número de espermatozoides que permanecieron unidos a las CEO. En la Figura 28 A se observa que la incubación con las hormonas durante 1 h no tuvo efecto sobre la liberación. Sin embargo, luego de 2 h de incubación con E, P o la combinación de ambas, se observó una disminución en el número de espermatozoides unidos a las CEO respecto al control (Figura 28 B). Luego de 4 h, si bien la incubación con las hormonas por separado indujo la liberación de los espermatozoides unidos, la incubación con ambas hormonas no llegó a ser significativamente distinta al control (Figura 28 C).



**Figura 28. Liberación de los espermatozoides de las CEO con hormonas ováricas.** **A)** 1 hora de incubación con las hormonas (n=5) ( $p>0,05$ ). **B)** 2 horas de incubación con las hormonas (n=10). **C)** 4 horas de incubación con las hormonas (n=4). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO).  $a \neq b$ ,  $p<0,05$ .

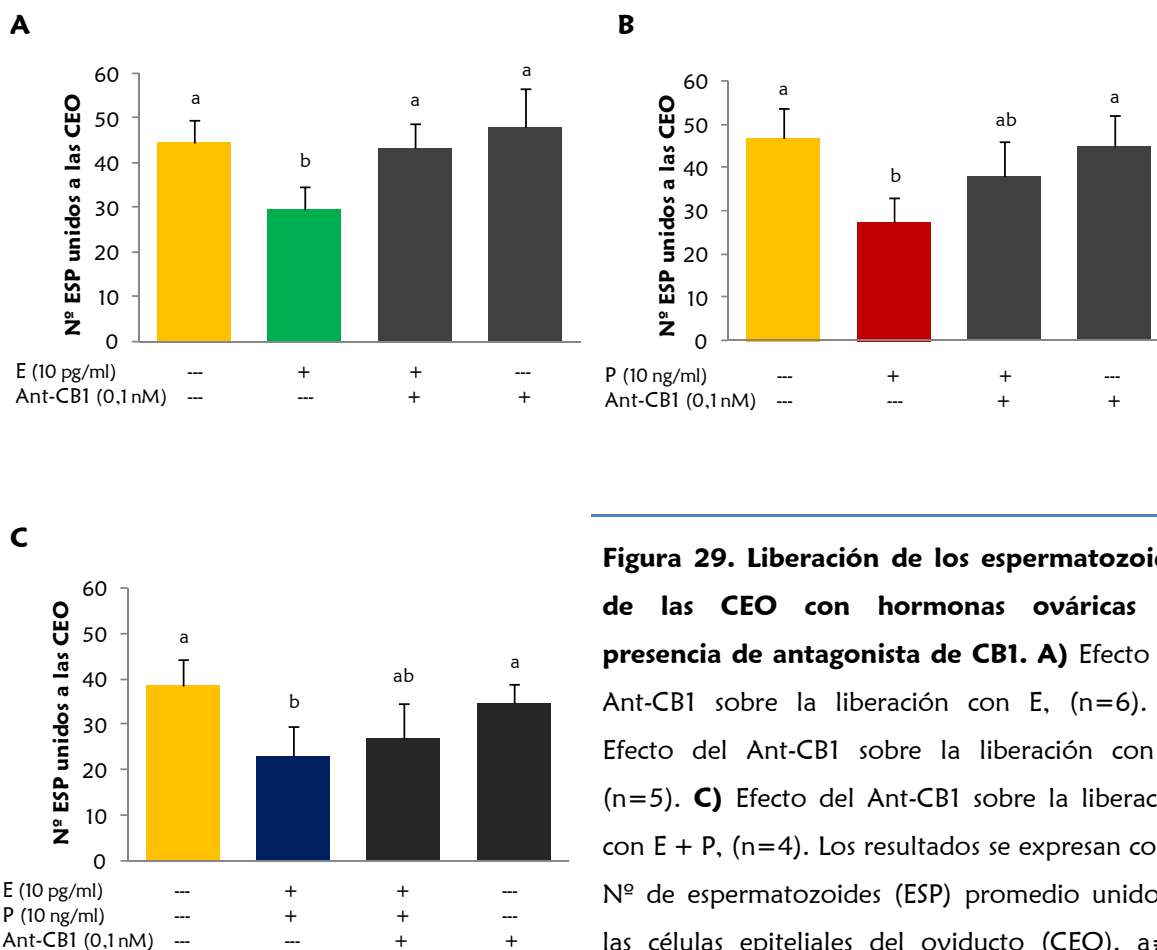
## **2.2. Interacción entre las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides de las CEO.**

Teniendo en cuenta que el E y la P promovieron la liberación de los espermatozoides de las CEO, se evaluó la posible relación entre las hormonas y el sistema endocannabinoide en este proceso fisiológico. Para ello, se realizaron experimentos de liberación de los espermatozoides de las CEO incubando con hormonas en presencia de un antagonista selectivo de los receptores de cannabinoides CB1 (SR141716A; Ant-CB1) o de un antagonista selectivo de los receptores de vanilloides TRPV1 (Capsazepina; Ant-TRPV1).

### **2.2.1. Participación de los receptores CB1 en el mecanismo de acción de las hormonas ováricas.**

Para determinar la participación del receptor CB1 en la liberación de los espermatozoides de las CEO por las hormonas, se realizaron co-cultivos espermatozoides-CEO los cuales fueron

incubados con E (10 pg/ml), P (10 ng/ml) o con ambas hormonas durante 2 h junto con el Ant-CB1 (0,1 nM). En la Figura 29 A se observa que el efecto de liberación dado por el E fue completamente inhibido en presencia del antagonista de los receptores CB1. La incubación con el Ant-CB1 no revirtió el efecto de la P o la combinación de E más P (Figuras 29 B y C respectivamente). Cabe destacar que en todos los casos el Ant-CB1 no tuvo un efecto *per se*.

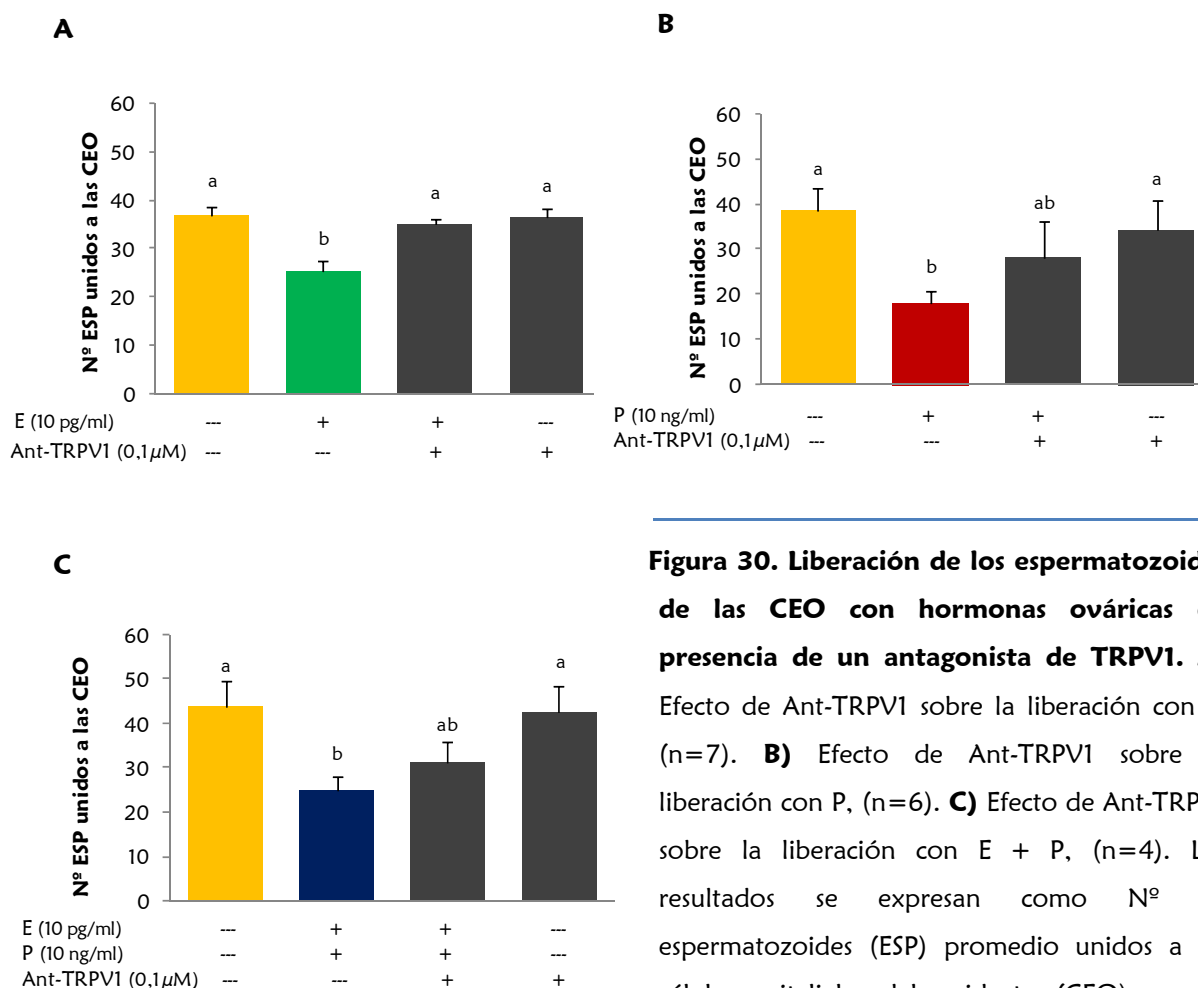


**Figura 29. Liberación de los espermatozoides de las CEO con hormonas ováricas en presencia de antagonista de CB1. A)** Efecto del Ant-CB1 sobre la liberación con E, (n=6). **B)** Efecto del Ant-CB1 sobre la liberación con P, (n=5). **C)** Efecto del Ant-CB1 sobre la liberación con E + P, (n=4). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO).  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

### 2.2.2. Participación de los receptores TRPV1 en el mecanismo de acción de las hormonas ováricas.

A fin de determinar si la activación del receptor TRPV1 estaba involucrada en el mecanismo de acción de las hormonas ováricas se realizaron experimentos de liberación de espermatozoides de las CEO en presencia de dichas hormonas junto al Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M) durante 2 h.

En la Figura 30 A se observa que la incubación con el Ant-TRPV1 revirtió significativamente el efecto del E. En cambio, la incubación con el Ant-TRPV1 bloqueó parcialmente el efecto de liberación de P o el de ambas hormonas juntas (Figuras 30 B y C respectivamente).



**Figura 30. Liberación de los espermatozoides de las CEO con hormonas ováricas en presencia de un antagonista de TRPV1. A)**

Efecto de Ant-TRPV1 sobre la liberación con E, (n=7). **B)** Efecto de Ant-TRPV1 sobre la liberación con P, (n=6). **C)** Efecto de Ant-TRPV1 sobre la liberación con E + P, (n=4). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO).  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

En conjunto, estos resultados sugerían que las hormonas ováricas, en particular el E, estaba activando la vía de acción que involucra a los endocannabinoides en el proceso de liberación de los espermatozoides de las CEO. Por ello el siguiente paso consistió en evaluar si las hormonas ováricas podían modular a los componentes del sistema endocannabinoide en las CEO o en los espermatozoides.

### ***2.3. Estudio de la expresión de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en espermatozoides y CEO.***

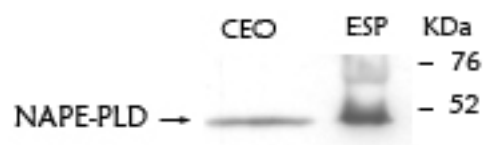
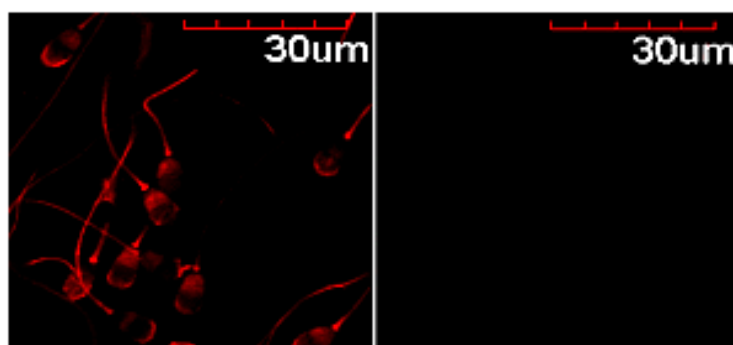
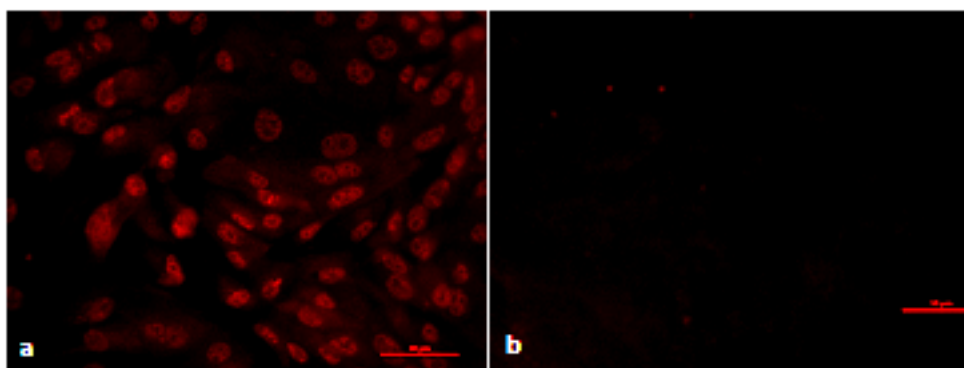
En primer lugar se estudió si los componentes del sistema de co-cultivo (espermatozoides y CEO) utilizado expresan las principales enzimas del metabolismo de la AEA.

La expresión de NAPE-PLD en ambos tipos celulares quedó evidenciada por la aparición de una banda de 46 KDa mediante la técnica de Western blot (Figura 31 A).

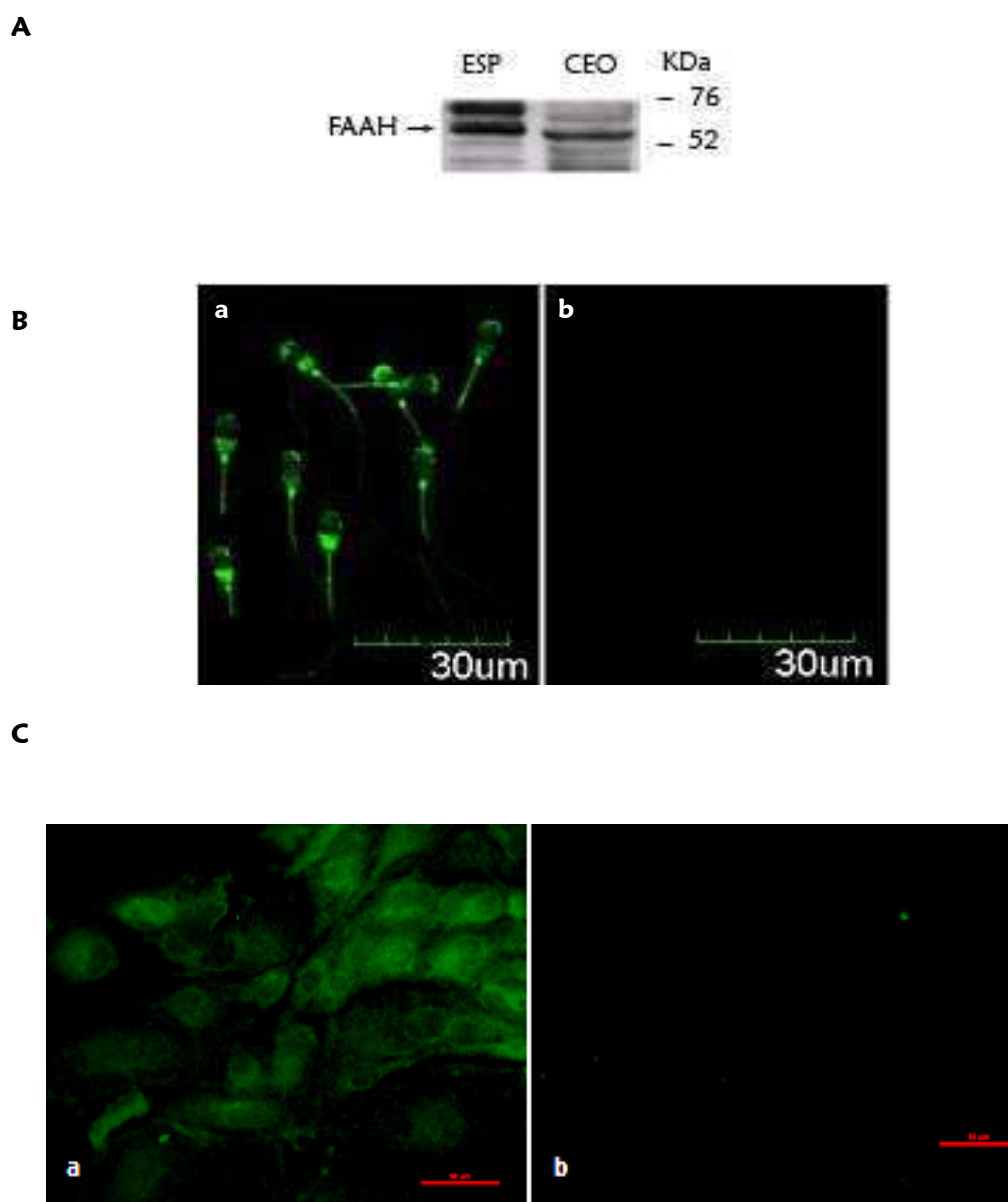
Además, la enzima se localizó principalmente en la cuña del acrosoma, en la región post-acrosomal y en la cola (Figura 31 B) del espermatozoide y en la membrana perinuclear de las CEO (Figura 31 C).

La expresión de FAAH se demostró por la aparición de una banda de peso molecular relativo de 58 KDa tanto en los espermatozoides como en las CEO (Figura 32 A), sugiriendo que ambos tipos celulares en cultivo expresan a la enzima.

Al igual que la NAPE-PLD, la enzima FAAH se encontró localizada principalmente en la cuña del acrosoma, en la región post-acrosomal y en la pieza media de la cola del espermatozoide (Figura 32 B). Sin embargo en las CEO esta enzima se encontró localizada en el citoplasma (Figura 32 C). En ambos casos no hubo marcación en los controles negativos.

**A****B****C**

**Figura 31.** Expresión y localización de NAPE-PLD en espermatozoides (ESP) y CEO bovinas. **A)** Fotografía representativa de la banda de 46 KDa obtenida correspondiente a la proteína NAPE-PLD tanto en ESP como en CEO (n=3). **B)** Localización de NAPE-PLD en ESP (n=3). a: inmunomarcación de NAPE-PLD; b: control negativo. **C)** Localización de NAPE-PLD en CEO (n=3). a: inmunomarcación de NAPE-PLD; b: control negativo. Barra = 50 μm.



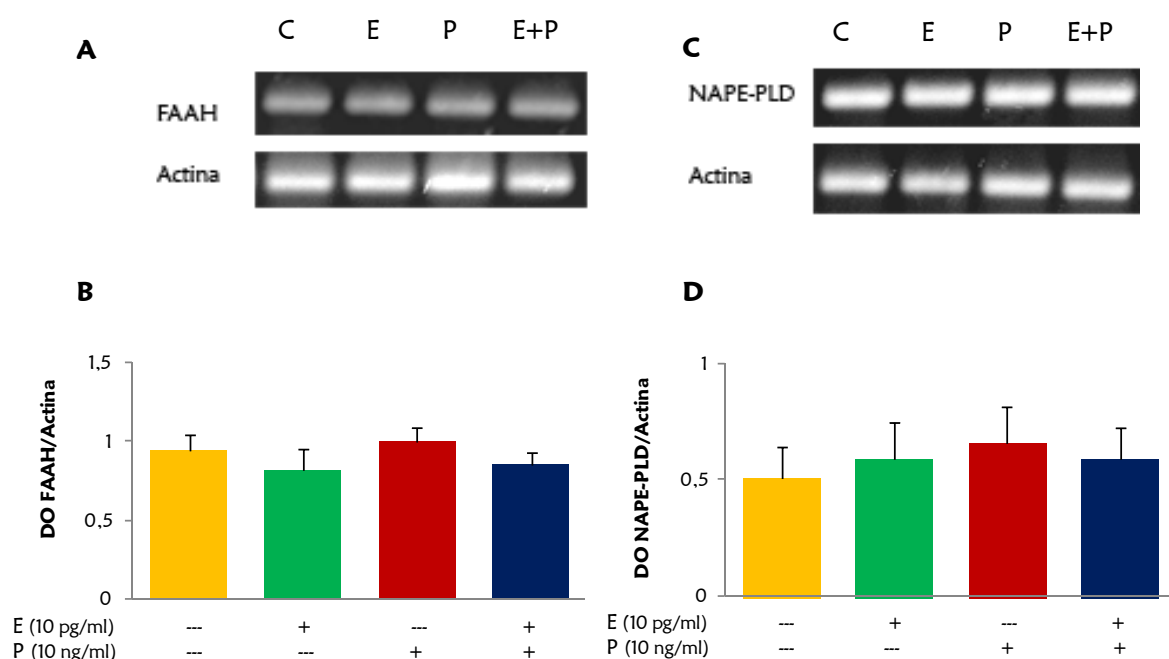
**Figura 32.** Expresión y localización de FAAH en espermatozoides (ESP) y CEO bovinas. **A)** Fotografía representativa de la banda de 58 KDa obtenida correspondiente a la proteína FAAH tanto en ESP como en CEO (n=3). ESP (-) indica la calle del control negativo. **B)** Localización de FAAH en ESP (n=3). a: inmunomarcación de FAAH; b: control negativo. **C)** Localización de FAAH en CEO (n=3). a: inmunomarcación de FAAH; b: control negativo. Barra = 50  $\mu$ m.



## 2.4. Estudio de la regulación del sistema endocannabinoide por las hormonas ováricas en CEO y espermatozoides.

### 2.4.1. Expresión de los mensajeros de FAAH y NAPE-PLD en CEO en cultivo

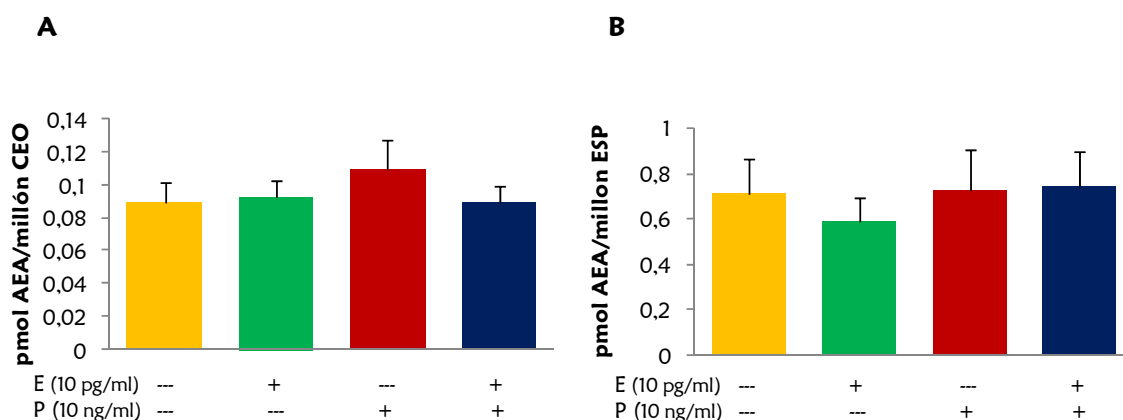
Para evaluar la posible regulación de la expresión de las enzimas del metabolismo de la AEA por las hormonas ováricas, se analizó, en primer lugar, la expresión del ARNm de las enzimas FAAH y NAPE-PLD en CEO luego de la incubación de las células epiteliales con E (10 pg/ml), P (10 ng/ml) o ambas hormonas durante 2 h. Por la técnica de PCR, no se observaron cambios en la expresión del mensajero de ninguna de las enzimas principales del metabolismo de la AEA (Fig 33 A y B: FAAH; Fig. 33 C y D: NAPE-PLD).



**Figura 33.** Expresión del ARN mensajero de las enzimas FAAH y NAPE-PLD en cultivos de CEO incubados con hormonas ováricas durante 2 h. **A)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas correspondientes al mensajero de 204 pb correspondiente a FAAH y al mensajero de 182 pb correspondiente a actina. C: control; E: estradiol; P: progesterona y E+P: estradiol + progesterona. **B)** Análisis de densitometría óptica (DO) de FAAH relativizada a actina (n=7). **C)** Fotografía representativa de las bandas obtenidas correspondientes al mensajero de 202 pb correspondiente a NAPE-PLD y al mensajero de 182 pb correspondiente a actina (n=7). C: control; E: estradiol; P: progesterona y E+P: estradiol + progesterona. **D)** Análisis de densitometría óptica (DO) de NAPE-PLD relativizada a actina (n=7).

### 2.4.2. Producción de AEA en CEO y espermatozoides

Por otro lado se estudió si las hormonas ováricas podían modular la producción de AEA *in vitro* en CEO en cultivo o en espermatozoides. Para ello se midió la producción de este endocannabinoides mediante la técnica de UPLC-MS/MS. En la Figura 34 A se observa que la producción de AEA en CEO no varió luego de la incubación con E, P o ambas hormonas durante 2 h. Un resultado similar se obtuvo cuando se midió la producción de AEA en los espermatozoides incubados con dichas hormonas (Figura 34 B). Es interesante destacar además que la producción de AEA por los espermatozoides es un orden mayor que la de las CEO, sugiriendo que los mismos podrían ser una fuente importante de AEA en el sistema de co-cultivo.



**Figura 34.** Efecto de las hormonas ováricas sobre la producción de AEA *in vitro*. **A)** Producción de AEA por las CEO. Se midió mediante HPLC-MS/MS la AEA presente en el sobrenadante de los cultivos luego de 2 h de incubación con las hormonas ováricas (n=9). **B)** Producción de AEA por los espermatozoides (ESP) durante 2 h de incubación con las hormonas ováricas (n=4). En ambos casos los resultados se expresaron como pmol de AEA por millón de células.  $p > 0,05$ .

En conjunto, estos resultados indican que las hormonas ováricas estarían participando en la liberación de los espermatozoides del oviducto, siendo el E la hormona involucrada en el mecanismo de activación de los receptores CB1 y TRPV1.

### **3. Estudio del mecanismo de acción de la AEA en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal en bovinos.**

Como se ha mencionado en la introducción, previamente en nuestro laboratorio hemos demostrado que la AEA participa en la interacción espermatozoide-oviducto en bovinos, en particular promoviendo la liberación de los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y/o TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). En esta parte del trabajo nos interesó profundizar el estudio del mecanismo de acción de la AEA en este proceso fisiológico. Para desarrollar este objetivo se evaluó la posible interacción entre los receptores CB1 y TRPV1 y la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en la vía de acción de AEA durante la liberación de los espermatozoides del oviducto.

#### **3.1. Estudio de la interacción entre los receptores CB1 y TRPV1 en la liberación de los espermatozoides de las CEO.**

Trabajos previos de otros autores indican que la activación del receptor TRPV1 depende de la activación de CB1 en células del sistema nervioso (Hermann y col., 2003; Ross, 2003).

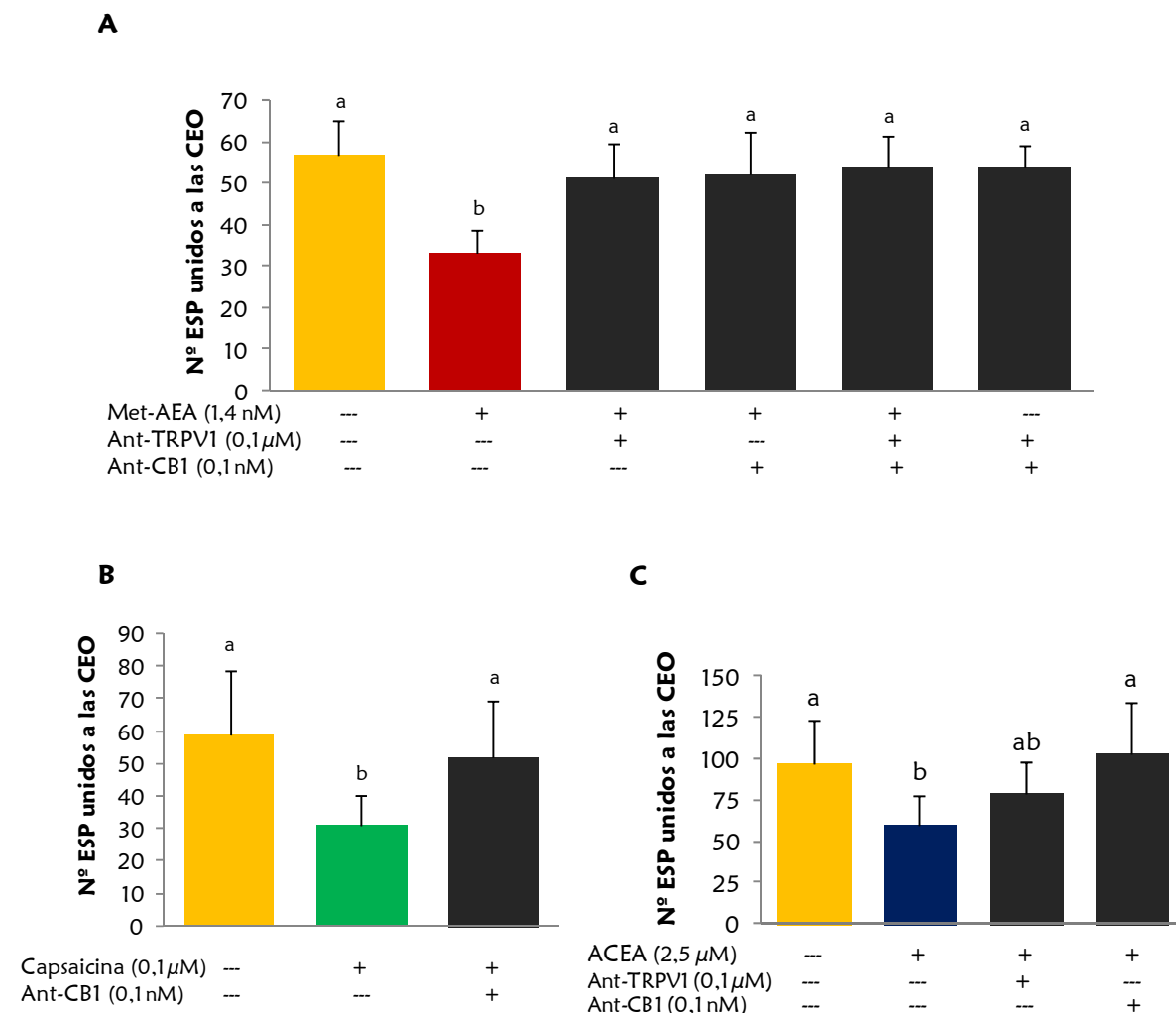
Para desarrollar estos experimentos, se realizaron co-cultivos de espermatozoides-CEO los cuales fueron incubados con Met-AEA (1,4 nM) junto con Ant-TRPV1 (0,1  $\mu\text{M}$ ) y/o Ant-CB1 (0,01 nM). La incubación con los antagonistas tanto por separado como en conjunto revirtió completamente la liberación de los espermatozoides de las CEO inducida por Met-AEA (Figura 35 A).

Además, a fin de determinar la posible relación entre ambos receptores, se realizaron experimentos de liberación utilizando un agonista selectivo de TRPV1 (capsaicina; 0,1  $\mu\text{M}$ ), un agonista selectivo de CB1 (ACEA; 10 nM), y los antagonistas selectivos de ambos receptores.

Previamente demostramos que la incubación del co-cultivo con capsaicina induce la liberación de los espermatozoides de las CEO y que la pre-incubación con Ant-TRPV1 revierte completamente el efecto del agonista de TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007). En este trabajo observamos que la liberación producida por capsaicina es revertida por la pre-incubación con el Ant-CB1, tal como se observa en la Figura 35 B.

Por otro lado se realizaron experimentos utilizando un agonista selectivo del receptor CB1. La incubación con ACEA indujo la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal al igual que la AEA y la Met-AEA y la preincubación con el Ant-CB1 revirtió completamente el efecto de la ACEA (Figura 35 C). Sin embargo, la pre-incubación con el Ant-TRPV1 atenuó el efecto de la ACEA.

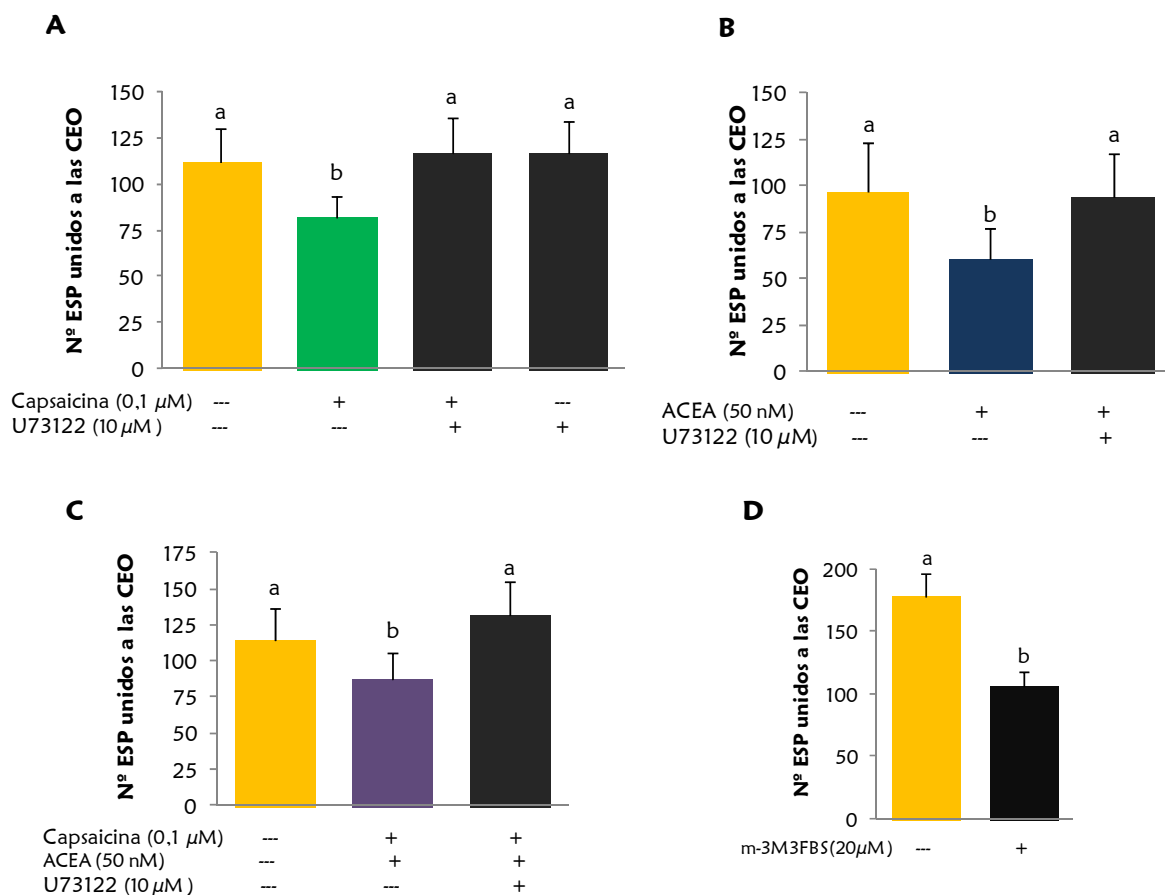
Estos resultados sugieren que es necesaria la activación conjunta de estos receptores por AEA para inducir la liberación de los espermatozoides de las CEO.



**Figura 35.** Participación de los receptores TRPV1 y CB1 en la liberación de los espermatozoides (ESP) de las CEO. **A)** Efecto de la incubación con Met-AEA en conjunto con el antagonista TRPV1 (Ant-TRPV1) y de CB1 (Ant-CB1) durante 15 min (n=4). **B)** Efecto de la incubación con capsaicina (agonista de TRPV1) más Ant-CB1 durante 15 min (n=4). **C)** Efecto de la incubación con un agonista de CB1 (ACEA) en conjunto con antagonistas de TRPV1 o CB1 sobre la liberación de los espermatozoides (n=5). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO).  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

Es sabido que la activación de CB1 involucra la vía de señalización de PLC en células de la línea HEK-293 (Ross, 2003). En esta línea celular, donde hay co-expresión de los receptores CB1 y TRPV1, se ha encontrado que la activación de TRPV1 está mediada por CB1 y en la vía

de señalización también estaría involucrada una PLC. La activación de PLC, vía CB1, podría liberar a TRPV1 de la inhibición tónica mediada por PIP<sub>2</sub>. Dado que en nuestro sistema los espermatozoides co-expresan CB1 y TRPV1 y que la liberación de los espermatozoides del oviducto está mediada por la activación de estos receptores, decidimos investigar la posible participación de la PLC en el proceso de liberación inducido por la activación de estos receptores.



**Figura 36.** Participación de la PLC en la liberación de los espermatozoides (ESP) de las CEO inducida por agonistas de los receptores de cannabinoides y vanilloides. **A)** Efecto de la incubación con capsaicina (agonista de TRPV1) en conjunto con un inhibidor de PLC (U73122) durante 15 min (n=6). **B)** Efecto de la incubación con ACEA (agonista de CB1) en conjunto con el inhibidor de PLC durante 15 min (n=5). **C)** Efecto de la incubación con capsaicina y ACEA en conjunto con el inhibidor de PLC sobre la liberación de espermatozoides (n=5). **D)** Efecto de la incubación con el activador de PLC (m-3M3FBS) en la liberación de espermatozoides (n=6). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO).  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

En primer lugar se realizaron experimentos de co-cultivo con capsaicina junto con un inhibidor de la enzima PLC (U73122; 10  $\mu$ M). La incubación con U73122 inhibió el efecto de liberación de los espermatozoides observado con capsaicina sugiriendo que es necesaria la activación de una PLC para que pueda activarse TRPV1 durante la liberación de los espermatozoides (Figura 36 A). Además, la incubación con el inhibidor de PLC revirtió el efecto de la ACEA en la liberación de los espermatozoides de las CEO (Figura 36 B). Por su parte, la liberación de los espermatozoides producida por la incubación con capsaicina y ACEA fue revertida en presencia del inhibidor de la enzima PLC indicando nuevamente que la activación de esta enzima podría estar involucrada en las vías de activación de ambos receptores (Figura 36 C).

En concordancia con los resultados previos, la utilización de un activador específico de PLC indujo la liberación de los espermatozoides de las CEO (Figura 36 D).

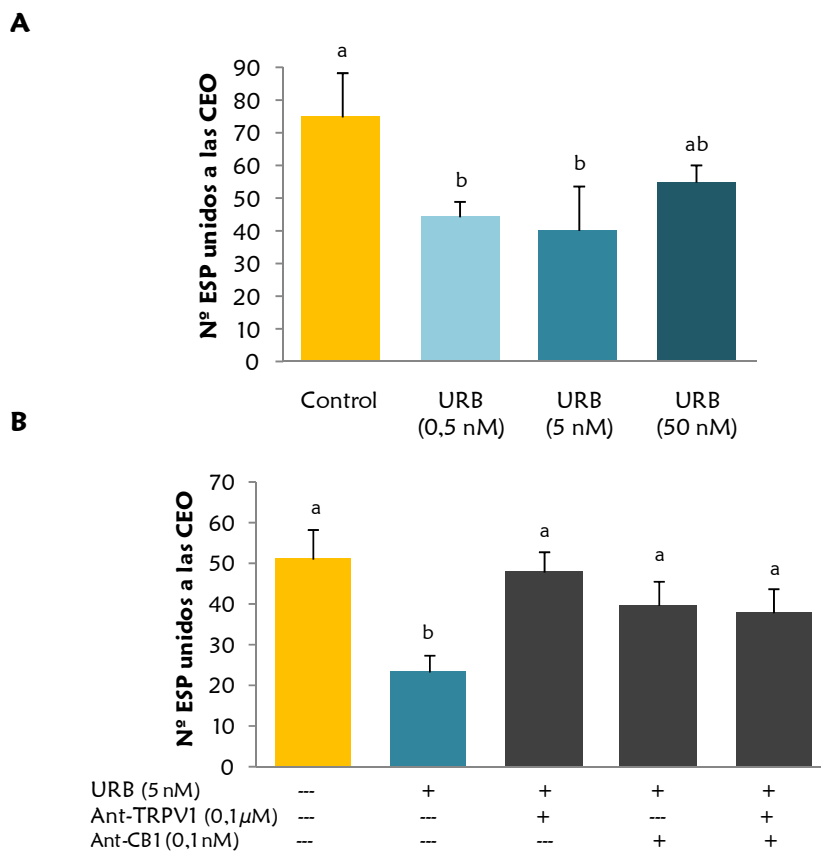
### ***3.2. Efecto de la inhibición de FAAH en la liberación de los espermatozoides de las CEO.***

Hasta aquí hemos estudiado la interacción de los receptores CB1 y TRPV1 utilizando agonistas exógenos de los mismos en el proceso de liberación de los espermatozoides de las CEO. Además, hemos demostrado que tanto los espermatozoides como las CEO poseen las enzimas necesarias para la síntesis y degradación de AEA. Teniendo en cuenta estos resultados, en esta parte del trabajo se estudió si un incremento de AEA endógena puede inducir la liberación de los espermatozoides de las CEO a través del mecanismo descrito.

En esta serie de experimentos se incubó a las células en co-cultivo con un inhibidor específico de la enzima FAAH (URB597). El efecto que produce la inhibición de la FAAH es un aumento de los niveles de AEA endógena, dado que esta enzima es la principal encargada de degradar a este endocannabinoide. En la Figura 37 A se grafican los resultados, los cuales indicaron que la incubación con 0,5 ó 5 nM de URB597 induce la liberación de los espermatozoides de las CEO. Estos resultados sugieren que la inhibición de la enzima FAAH estaría incrementando los niveles de AEA y de esta manera podría promover la liberación de los espermatozoides unidos a las CEO.

Posteriormente se estudió si los receptores CB1 y TRPV1 median el efecto desencadenado por la inhibición de FAAH. Para ello se realizaron experimentos de liberación incubando los co-cultivos con URB597 (5 nM) en presencia del Ant-CB1 (0,1 nM) y del Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M). En la Figura 37 B se observa que tanto la incubación con los antagonistas por separado como

en conjunto revirtió el efecto de liberación de los espermatozoides de las CEO observado con el inhibidor de FAAH.



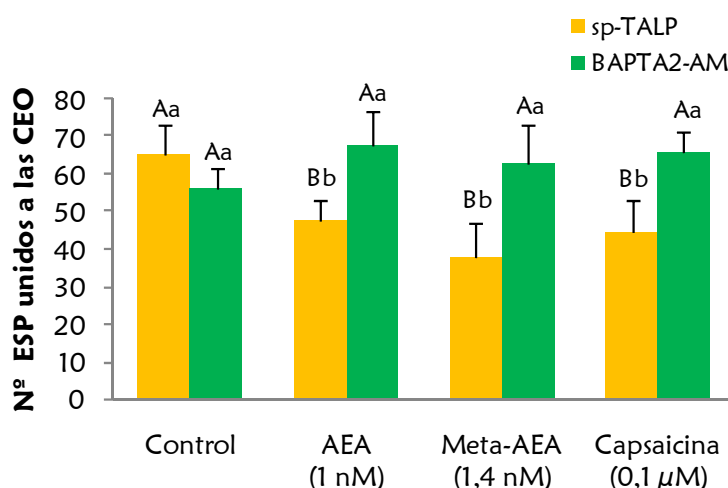
**Figura 37.** Efecto de la inhibición de la FAAH en la liberación de los espermatozoides (ESP) de las CEO. **A)** Efecto de la incubación con distintas concentraciones de un inhibidor específico de la enzima FAAH (URB) durante 15 min (n=6). **B)** Efecto de la incubación con URB junto con el Ant-TRPV1 o el Ant-CB1 durante 15 min (n=4). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO). a≠b, p<0,05.

### ***3.3. Evaluación del $Ca^{2+}$ como parte del mecanismo de acción de AEA en la liberación de los espermatozoides de las CEO.***

En los puntos anteriores hemos demostrado que la AEA induce la liberación de los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y TRPV1. Teniendo en cuenta que el receptor TRPV1 es un canal de cationes no selectivo y que se ha descrito previamente un incremento de  $Ca^{2+}$  intracelular en los espermatozoides liberados del epitelio

oviductal (Petrunkina y col., 2001), nos propusimos evaluar la participación de este ión como parte del mecanismo de acción de AEA en este proceso.

Para llevar a cabo estos experimentos, se realizaron co-cultivos de CEO con espermatozoides pre-tratados con o sin BAPTA2-AM (quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) los cuales fueron incubados con AEA (1 nM), Met-AEA (1,4 nM) o capsaicina (0,1  $\mu\text{M}$ ) para inducir la liberación. Los resultados obtenidos indicaron que la pre-incubación de los espermatozoides con el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibe el efecto de los agonistas de cannabinoides y vanilloides (Figura 38), sugiriendo que tanto los agonistas de los receptores de cannabinoides utilizados, como la capsaicina inducen la liberación de los espermatozoides de las CEO mediante un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides.

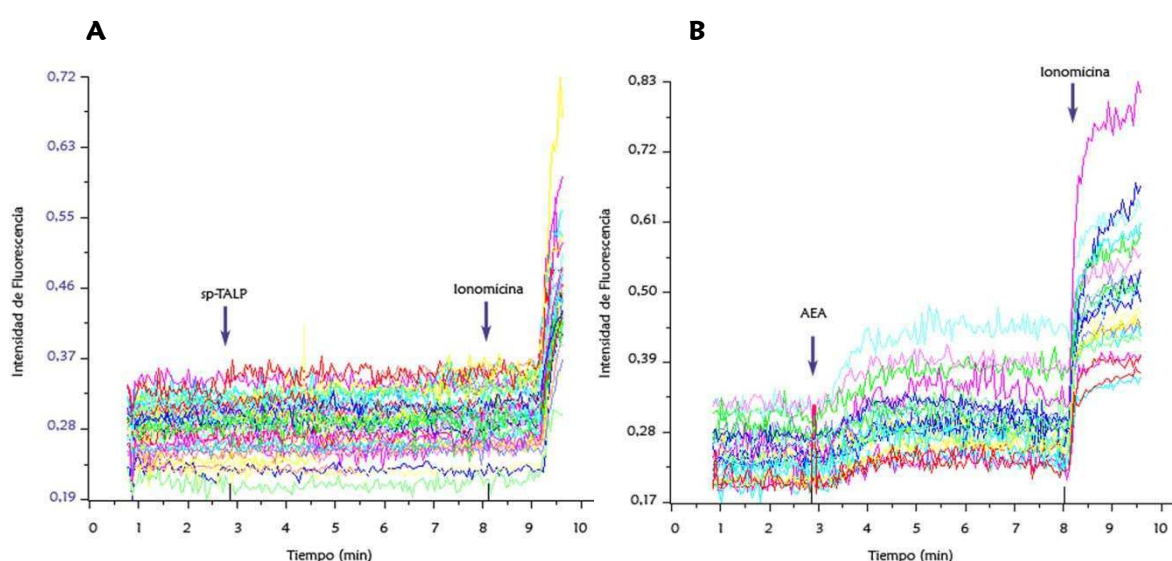


**Figura 38.** Participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el mecanismo de acción de la AEA y la capsaicina. Efecto de la incubación con BAPTA2-AM (quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular) junto con agonistas de los receptores de cannabinoides y vanilloides en la liberación de los espermatozoides de las CEO (n=5). Los resultados se expresan como Nº de espermatozoides (ESP) promedio unidos a las células epiteliales del oviducto (CEO). A $\neq$ B entre los distintos tratamientos dentro de un mismo grupo (sp-TALP o BAPTA2-AM),  $p < 0,05$ ; a $\neq$ b entre ambos grupos,  $p < 0,05$ .

Dado que los resultados anteriores nos indicaban que el  $\text{Ca}^{2+}$  espermático podría estar participando en el mecanismo de acción de AEA en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal, el siguiente paso consistió en determinar el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular



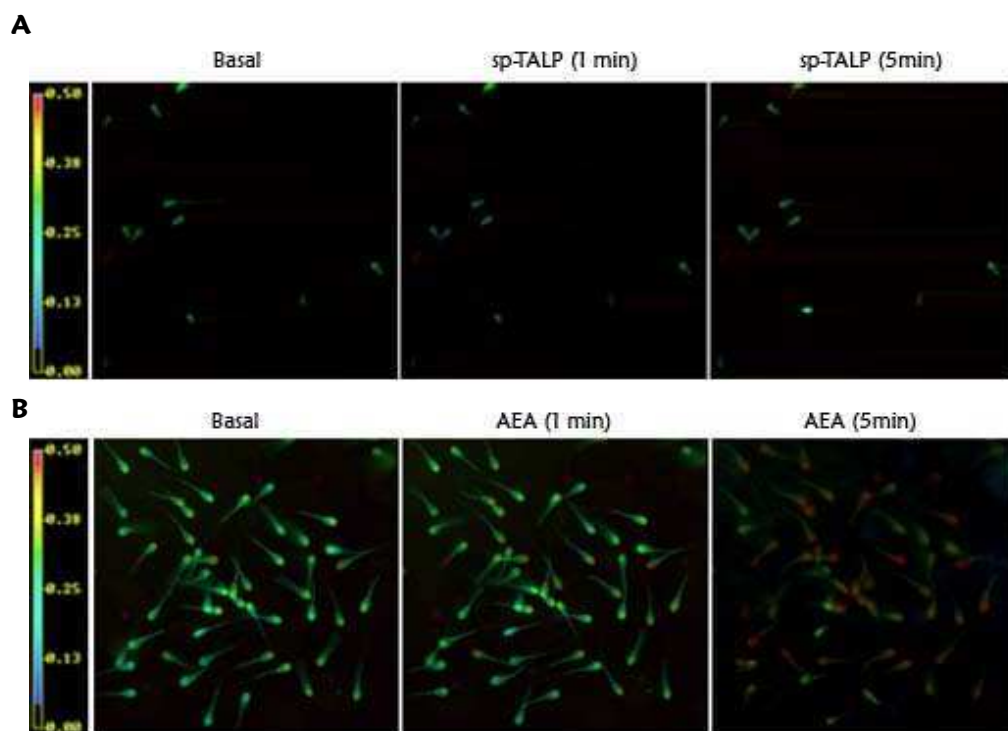
en espermatozoides en co-cultivo con CEO. De acuerdo a la técnica utilizada para realizar estas mediciones, los cambios en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides representan cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular de los mismos, siendo los espermatozoides rojos aquellos que poseen mayor  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular. En el gráfico de la Figura 39 A se observa como la intensidad de fluorescencia en espermatozoides en co-cultivo con CEO tratados durante 5 min con medio sp-TALPm (control) se mantuvo estable. En cambio, en el gráfico de la Figura 39 B se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia que representa un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en los espermatozoides en co-cultivo con las CEO luego de ser incubados con AEA (1 nM).



**Figura 39.** Medida del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en espermatozoides en co-cultivo con CEO. **A)** Efecto del tratamiento con medio sp-TALPm (control) durante 5 min. **B)** Efecto del tratamiento con AEA (1 nM) durante 5 min. Tanto en A como en B las distintas líneas de colores representan la intensidad de fluorescencia registrada en la cabeza de un único espermatozoide. Además, en ambos casos se utilizó ionomicina al finalizar los 5 min de incubación como control positivo.

En la figura 40 se muestra un ejemplo representativo de los cambios en intensidad de fluorescencia que ocurren en los espermatozoides en co-cultivo con CEO incubados con medio sp-TALPm o con AEA (1n M). Mientras que en el panel A que representa al control no hubo cambios en la intensidad de fluorescencia de los espermatozoides, en el panel B que representa al tratamiento con AEA se observa que los espermatozoides adquirieron una coloración rojiza

a medida que transcurrió el tiempo de incubación, indicando un incremento en la intensidad de fluorescencia.



**Figura 40.** Medida del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en espermatozoides en co-cultivo con CEO. **A)** Microfotografías que muestran una secuencia representativa de la intensidad de fluorescencia basal de la cabeza de los espermatozoides y luego de la adición de medio sp-TALPm ( $A=400 \times$ ). **B)** Microfotografías que muestran una secuencia representativa de la intensidad de fluorescencia basal de la cabeza de los espermatozoides y el cambio de intensidad luego de la adición de AEA ( $A=400 \times$ ).

Para el análisis de los datos de estas mediciones, se calculó el porcentaje de espermatozoides que aumentó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante los 5 min de tratamiento. Los resultados indicaron que una población de espermatozoides de aproximadamente el 40 %, tanto en los tratados como en los controles, responden a un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lapso de tiempo evaluado (Tabla 10).

Tratamiento	% ESP que aumentaron $\text{Ca}^{2+}$
Control	42,26 $\pm$ 8,31
AEA (1nM)	38,89 $\pm$ 9,54
AEA (1nM) + Ant-TRPV1 (0,1 $\mu\text{M}$ )	36,02 $\pm$ 11,95
AEA (1 nM) + Ant-CB1 (0,1 nM)	45,75 $\pm$ 10,73

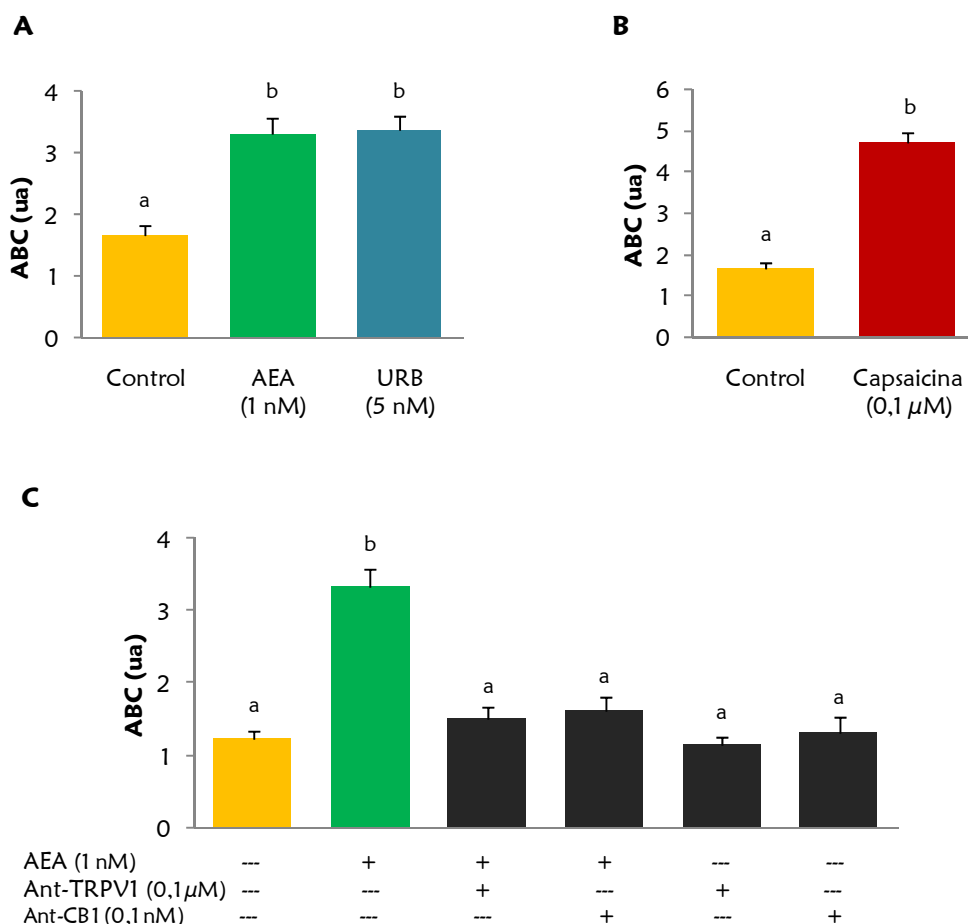
**Tabla 10.** Proporción de espermatozoides (ESP) unidos a las CEO que incrementaron los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante 5 min de tratamiento.

Para el análisis de los datos se seleccionó la subpoblación de espermatozoides que incrementó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en todos los tratamientos. Los datos correspondientes a cada espermatozoide se analizaron y se expresaron como área bajo la curva (ABC) de la intensidad de fluorescencia durante los 5 min de tratamiento menos la intensidad de fluorescencia basal (ver Materiales y Métodos, apartado 9).

La evaluación de los datos indicó que tanto el agregado de AEA exógena como de un inhibidor de la FAAH (URB597) produjo un incremento en el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular espermático respecto a la incubación con medio sp-TALPm solo (Figura 41 A).

Para estudiar la participación del receptor/canal TRPV1 en la regulación de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  espermáticos en nuestro sistema, se evaluó la incubación con un agonista selectivo de TRPV1. La incubación con capsaicina incrementó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en espermatozoides unidos a las CEO (Figura 41 B). Además el tratamiento con el Ant-TRPV1 inhibió el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado con AEA (Figura 41 C).

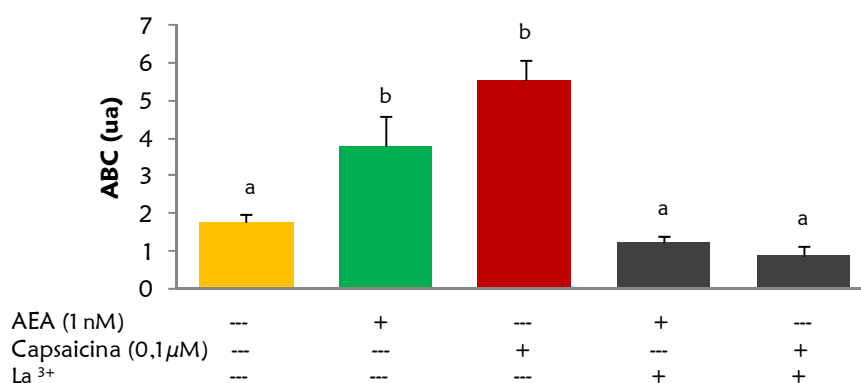
Por su parte, se evaluó la participación del receptor CB1 en este mecanismo encontrándose que el tratamiento con el Ant-CB1 también bloqueó el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  inducido por AEA (Figura 41 C). Es importante destacar que la incubación con los antagonistas solos no produjo cambios en el  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular.



**Figura 41.** Medida del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular en espermatozoides (ESP) en co-cultivo con CEO.

**A)** Efecto del tratamiento con medio sp-TALP (control), con AEA (1 nM) o con URB (5 nM) durante 5 min. **B)** Efecto del tratamiento con capsaicina (0.1 μM) durante 5 min. **C)** Efecto del tratamiento con AEA (1 nM) y antagonistas de TRPV1 o CB1 (Ant-TRPV1 o Ant-CB1). Control: n=11, AEA: n=15, URB: n=5, capsaicina: n=11, AEA + Ant-TRPV1: n= 7, AEA + Ant-CB1: n=11, Ant-TRPV1: n=4, Ant-CB1: n=3. En todos los casos  $a \neq b$ ,  $p < 0.05$ .

Finalmente se investigó si el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado era producto de la entrada desde el espacio extracelular. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de medición de  $\text{Ca}^{2+}$  con AEA (1 nM) o capsaicina (0.1 μM) en presencia de  $\text{La}^{3+}$  (Lantano; bloqueador inespecífico de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ). En la Figura 42 se observa que la incubación con este bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibió el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular inducido por AEA ó capsaicina, apoyando la hipótesis de que el mecanismo involucrado en el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  espermático inducido por los agonistas cannabinoides y vanilloides sería a través de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular.



**Figura 42.** Medida de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Efecto del tratamiento con un bloqueador inespecífico de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{La}^{3+}$ ). Control:  $n=11$ , AEA:  $n=15$ , capsaicina:  $n=11$ , AEA +  $\text{La}^{3+}$ :  $n=3$ , capsaicina +  $\text{La}^{3+}$ :  $n=3$ .  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

Estos resultados sugieren que el  $\text{Ca}^{2+}$  forma parte del mecanismo de acción de la AEA como inductor de la liberación de los espermatozoides de las CEO.

Debido a que la capacitación espermática es una de las posibles causas de liberación y además es un proceso que se encuentra directamente asociado a un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides, el siguiente paso fue estudiar si la AEA participa en la regulación del proceso de capacitación espermática en bovinos.

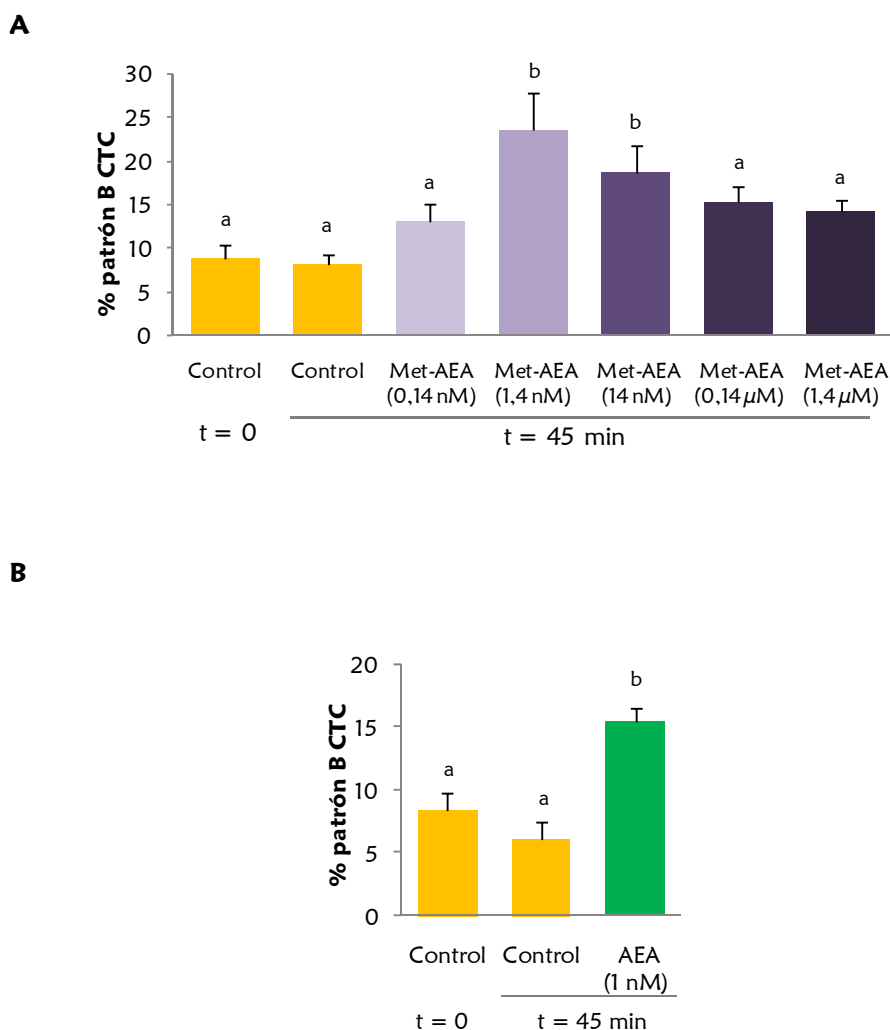
### **3.4. Participación de la AEA en la capacitación espermática en bovinos.**

Durante el proceso de capacitación espermática se producen cambios bioquímicos y estructurales en el espermatozoide que incluyen: cambios en la fluidez de la membrana plasmática y, el incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular y en la fosforilación en los residuos tirosina de las proteínas. Para investigar la función de la AEA en el proceso de capacitación espermática en bovinos, los espermatozoides fueron capacitados *in vitro* y se evaluó la capacitación mediante las técnicas de CTC, de inducción de la reacción acrosomal con LPC evaluada por PSA-FITC y la fosforilación de residuos tirosina por Western blot.

En primer lugar se realizaron estudios de capacitación espermática en presencia de distintas concentraciones de Met-AEA. Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos indicaron que la incubación de los espermatozoides en medio *sp*-TALP con Met-AEA, en concentraciones nanomolares (1,4 y 14 nM) incrementó el porcentaje de células con patrón B de CTC (patrón de espermatozoide capacitado) respecto a aquellos que fueron incubados

solamente con sp-TALP. Estos resultados indican que AEA estaría actuando como un agente capacitante en bovinos (Figura 43 A).

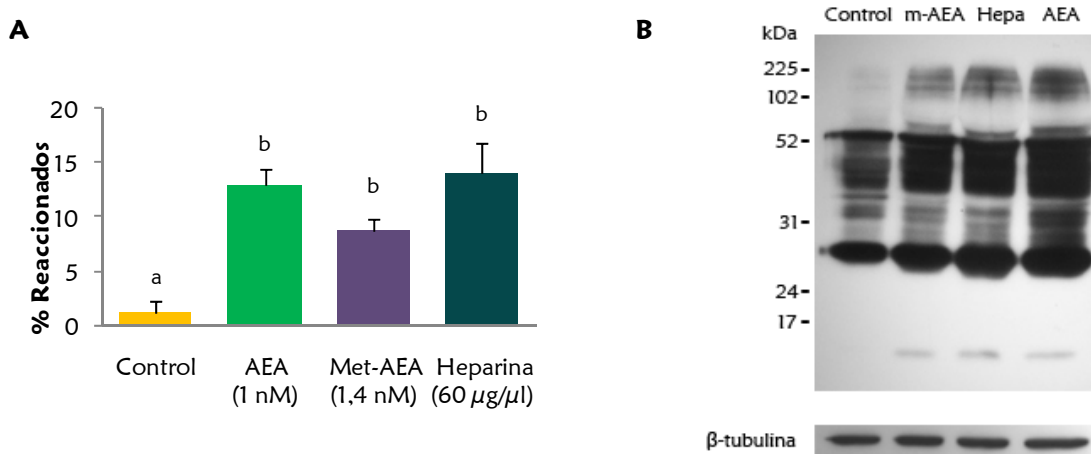
El mismo resultado se observó incubando a los espermatozoides con AEA (1 nM) ya que concentraciones nanomolares de este endocannabinoide también indujeron un aumento en el porcentaje de espermatozoides capacitados respecto al control (Figura 43 B).



**Figura 43.** Efecto de Met-AEA y AEA en la capacitación espermática. Los espermatozoides fueron incubados durante 45 min en medio sp-TALP con Met-AEA o AEA y la capacitación espermática se evaluó por la técnica de CTC. Las barras indican el porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B de CTC). **A)** Efecto del tratamiento con concentraciones crecientes de Met-AEA, Control (t=0 y t=45) corresponde a la incubación con sp-TALP durante 0 o 45 min respectivamente, (n=5). **B)** Efecto del tratamiento con AEA (1 nM), Control (t=0 y t=45) corresponde a la incubación con sp-TALP durante 0 o 45 min respectivamente, (n=6). En ambos casos  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

En los espermatozoides bovinos, la reacción acrosomal inducida por LPC es un marcador apropiado de capacitación espermática ya que sólo los espermatozoides capacitados sufren reacción acrosomal en presencia de este agente (Parrish y col., 1988). En la Figura 44 A se observa que la incubación con concentraciones nanomolares de Met-AEA o AEA incrementó el porcentaje de espermatozoides reaccionados que respondieron al LPC del mismo modo que la heparina (un conocido agente capacitante en bovinos, utilizado como control positivo).

Además, se evaluó la expresión de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina en espermatozoides capacitados en presencia de Met-AEA (1,4 nM), AEA (1 nM) o heparina (60  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). El análisis de los patrones de fosforilación en tirosina, indicó que la incubación de los espermatozoides con estos agentes produjo un incremento en la fosforilación en residuos tirosina de varias proteínas tal como se muestra en la fotografía representativa en la Figura 44 B.



**Figura 44.** Efecto de Met-AEA y AEA en la capacitación espermática. Los espermatozoides fueron incubados durante 45 min en medio sp-TALP con Met-AEA o AEA y la capacitación espermática se evaluó por las técnicas de inducción de la reacción acrosomal con LPC y fosforilación en residuos tirosina. **A)** Efecto del tratamiento con sp-TALP (Control), AEA (1 nM), Met-AEA (1,4 nM) o Heparina (control positivo) durante 45 min. Las barras indican la diferencia entre el porcentaje de espermatozoides reaccionados con el LPC y el porcentaje de espermatozoides reaccionados espontáneamente, (n=4).  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ . **B)** Evaluación de la fosforilación en residuos tirosina mediante Western blot. Efecto del tratamiento con sp-TALP (Control), Met-AEA (indicado como m-AEA), Heparina (control positivo, indicado como Hepa) o AEA (1 nM) durante 45 min sobre la fosforilación en residuos tirosina. Se utilizó  $\beta$ -tubulina como control de carga, (n=3).

Hasta aquí, los resultados indican que concentraciones nanomolares tanto de AEA como de Met-AEA inducen la capacitación espermática en espermatozoides bovinos.

### ***3.5. Estudio de las posibles vías de activación de AEA en la capacitación espermática en bovinos.***

Teniendo en cuenta que la capacitación espermática es una de las posibles causas de la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal y que nuestros resultados indicaban que la AEA participa en ambos procesos, nos propusimos estudiar si las vías de activación de este endocannabinoide en la capacitación está mediada por los mismos receptores que se activan en el proceso de liberación.

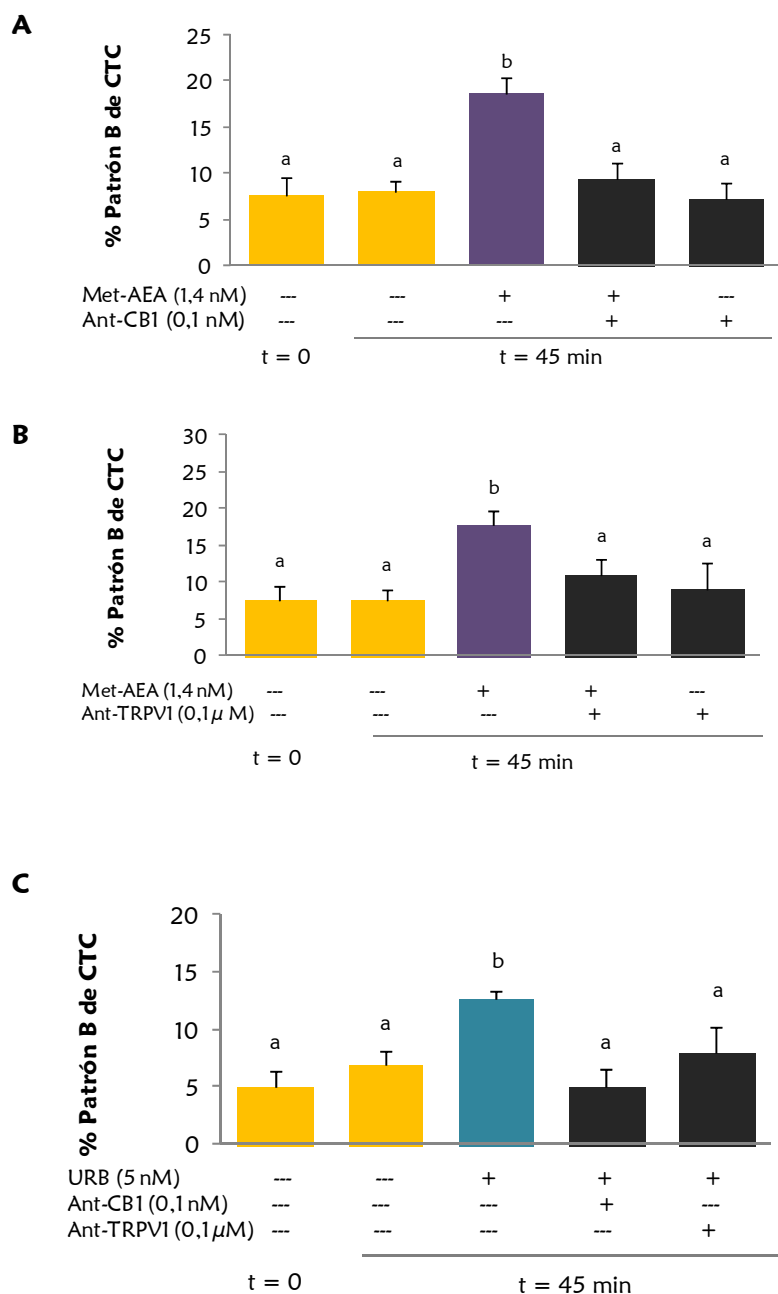
Para llevar a cabo este objetivo, se realizaron capacitaciones *in vitro* con Met-AEA (1,4 nM) junto con el Ant-CB1 (0,1 nM) o el Ant-TRPV1 (0,1  $\mu$ M).

El efecto capacitante de Met-AEA fue revertido completamente por la incubación con el Ant-CB1 (Figura 45 A). Estos resultados indican que los receptores CB1 están involucrados en la capacitación espermática inducida por AEA.

Además, se estudió la participación de los receptores TRPV1 en este proceso. En la Figura 45 B se observa que la incubación con el Ant-TRPV1 revirtió el efecto de Met-AEA en la capacitación espermática, indicando que estos receptores también forman parte del mecanismo de acción de AEA en este proceso. Es importante destacar que la incubación con los antagonistas por sí solos no tuvo efecto.

Por último, se realizaron capacitaciones *in vitro* con URB597, a fin de estudiar si la inhibición de la enzima FAAH y por ende un aumento de AEA endógena, tenía efecto sobre la capacitación espermática. Como resultado se obtuvo que la incubación con el inhibidor de FAAH incrementó el porcentaje de espermatozoides capacitados respecto a los controles (Figura 45 C). Del mismo modo que con los agonistas exógenos, el efecto de un incremento de AEA endógena fue revertido por la incubación con el Ant-CB1 o con el Ant-TRPV1, reforzando la idea de que los receptores CB1 y TRPV1 son activados por AEA durante la capacitación espermática.





**Figura 45.** Evaluación de la participación de los receptores CB1 y TRPV1 en la capacitación espermática inducida por Met-AEA o AEA endógena. Los espermatozoides fueron incubados durante 45 min en medio sp-TALP con Met-AEA junto con antagonistas de los receptores de cannabinoides y vanilloides. La capacitación espermática se evaluó por la técnica de CTC. Las barras indican el porcentaje de espermatozoides capacitados (patrón B de CTC). **A)** Efecto del tratamiento con Met-AEA (1,4 nM) junto con Ant-CB1 durante 45 min, (n=4). **B)** Efecto del tratamiento con Met-AEA (1,4 nM) junto con Ant-TRPV1 durante 45 min, (n=6). **C)** Efecto del tratamiento con URB597 (inhibidor de FAAH) junto con Ant-CB1 o Ant-TRPV1, (n=5). En todos los casos  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

Hasta aquí los resultados sugieren que la inducción de la capacitación espermática sería parte del mecanismo de acción de AEA mediante el cual se promueve la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal en el momento peri-ovulatorio.

Debido a que la AEA indujo la liberación *in vitro* de espermatozoides en co-cultivo con CEO, nuestro último objetivo consistió en caracterizar a la población de espermatozoides liberados con AEA a fin de determinar su potencial capacidad fecundante.

### **3.6. Caracterización de la población de espermatozoides liberados de las CEO.**

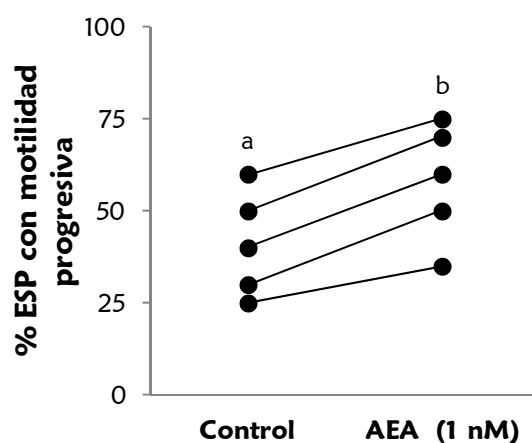
Con el objetivo de caracterizar a la población de espermatozoides liberados *in vitro* en los experimentos de co-cultivo espermatozoides-CEO, se colectaron los espermatozoides liberados con AEA (1 nM) y los liberados espontáneamente con sp-TALPm (controles). A estos espermatozoides se les determinaron distintos parámetros espermáticos: estado de capacitación, estado acrosomal, viabilidad y motilidad.

Como se observa en la Tabla 11 tanto el porcentaje de espermatozoides capacitados (evaluado por la técnica de CTC), de espermatozoides con acrosoma intacto y de espermatozoides vivos fue similar en la población de espermatozoides liberados con AEA como con medio sp-TALPm. Cabe destacar que el número de espermatozoides liberados con AEA es mayor al número de espermatozoides liberados control (un 40% mayor en los tratados), lo que sugiere que si bien los porcentajes de los patrones espermáticos analizados son similares, el número neto de espermatozoides capacitados, con acrosoma intacto y viables es mayor en la población de espermatozoides liberados con AEA.

Parámetro	Liberados Control	Liberados AEA (1 nM)
<b>% Capacitación</b>	36,0 ± 4,9 a	38,9 ± 7,1 a
<b>% Acrosoma intacto</b>	77,92 ± 2,95 a	77,5 ± 5,68 a
<b>% Viabilidad</b>	90,6 ± 2,2 a	88,9 ± 0,9 a

**Tabla 11.** Medida de distintos parámetros espermáticos en los espermatozoides (ESP) liberados control o con AEA (1 nM). Se analizó el % de capacitación por CTC, el % de ESP que presentaron el acrosoma intacto y el % de ESP vivos con Hoescht en la población de ESP liberados en los experimentos de co-cultivo. En todos los casos  $a \neq b$ ,  $p < 0,05$ .

Por otro lado, el análisis de la motilidad progresiva indicó que los espermatozoides liberados con AEA presentan un incremento significativo en este parámetro respecto a los liberados espontáneamente de las CEO (Figura 46).



**Figura 46.** Evaluación de la motilidad de espermatozoides (ESP) liberados con sp-TALP o AEA (1 nM). Cada par de puntos representa alícuotas de espermatozoides del mismo toro liberados con sp-TALP o AEA (n=5). a≠b p<0,05.

En conjunto, estos resultados indican que la AEA estaría participando en la regulación de la interacción de los espermatozoides con el epitelio oviductal favoreciendo la liberación de una población de espermatozoides capacitados y con motilidad progresiva, dos eventos necesarios para la adquisición de la capacidad fecundante.

El oviducto de los mamíferos actúa como un reservorio funcional de espermatozoides proveyendo un ambiente que permite su mantenimiento y competencia hasta la fecundación del oocito (Suarez, 2002). Al llegar al oviducto, los espermatozoides se unen a las células epiteliales del istmo para formar lo que se denomina reservorio oviductal (Hunter, 2008). Una de las funciones que se cree que posee la formación de este reservorio es seleccionar subpoblaciones de espermatozoides de alta calidad respecto a la morfología, la estructura de la cromatina, el estado del acrosoma y la motilidad (Pollard y col., 1991; Suarez y col., 1991; Ellington y col., 1998). El éxito de la fecundación depende de estos parámetros espermáticos entre otros factores. Se ha demostrado que la unión de los espermatozoides al epitelio oviductal prolonga la vida media de los mismos, hasta que señales asociadas a la ovulación inducen su liberación permitiendo que transiten hacia la ampolla donde ocurre el encuentro con el oocito y la fecundación (Coy y col., 2012). Hasta el momento es escasa la información acerca de la participación de moléculas de origen lipídico en dichos procesos. En los últimos años, en nuestro laboratorio hemos estudiado a la AEA como un mediador lipídico que participa en la regulación del proceso de interacción de los espermatozoides con las células epiteliales del oviducto (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). En el presente trabajo de tesis profundizamos en el estudio de los mecanismos de regulación y de acción de esta molécula y su participación en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino y en la funcionalidad espermática.

El control endócrino que ocurre durante el ciclo estral en el oviducto es clave para la regulación de la función oviductal y de la interacción entre este órgano con los espermatozoides (Hunter, 2012). Previamente hemos demostrado que la AEA induce la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino (Gervasi y col., 2009; Osycka-Salut y col., 2012). En el presente trabajo se midieron por primera vez los niveles de AEA y otras NAEs relacionadas en el oviducto bovino durante el ciclo estral. Las concentraciones fisiológicas de AEA, OEA y PEA detectadas en el fluido oviductal son del orden nanomolar y las mayores concentraciones fueron encontradas en el periodo peri-ovulatorio sugiriendo una modulación de los niveles de estos endocannabinoides a lo largo del ciclo estral. Además, la concentración de AEA es 15 y 40 veces menor que las concentraciones detectadas de OEA y PEA respectivamente. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que se encontraron niveles fisiológicos (nanomolares) de NAEs en distintos fluidos de humanos siendo comparable además la relación de concentración entre AEA, OEA y PEA como ser en plasma sanguíneo, fluido peritoneal, suero, leche y fluido amniótico (Lam y col., 2010); plasma seminal (Schuel y col., 2002a; Amoako y col., 2010); y ovario (El-Talatini y col., 2009a).

Nuestros resultados además indicaron que hay diferencias en los niveles de AEA entre el fluido oviductal proveniente del oviducto ipsilateral y el proveniente del oviducto contralateral a la ovulación, siendo mayores las concentraciones que se encontraron en el oviducto ipsilateral. Como fue mencionado en la introducción, hormonas producidas en los folículos ováricos maduros llegan a las arteriolas cercanas al oviducto ipsilateral y coordinan cambios en el epitelio y la funcionalidad del mismo sincrónicamente a la maduración del folículo (Hunter, 2012). En este sentido, las hormonas que llegan directamente al oviducto ipsilateral podrían estar modulando las enzimas del metabolismo de AEA en el mismo o, más aún, la AEA podría estar siendo producida por el folículo en crecimiento y llegar mediante este sistema vascular al oviducto ipsilateral. Es interesante destacar que no hay diferencias en la concentración de OEA y PEA del fluido oviductal entre el oviducto ipsilateral y contralateral, sugiriendo que al menos su producción no estaría bajo el control endócrino relacionado con el folículo ovulatorio.

A su vez, los niveles intracelulares de AEA en las células epiteliales del oviducto bovino fluctuaron a lo largo del ciclo estral, y en concordancia con lo hallado en el fluido oviductal los mayores niveles de estas moléculas se encontraron durante los estadios correspondientes al período peri-ovulatorio. Resultados similares obtuvo el grupo de El-Talatini y col. (2010) al medir la concentración de AEA plasmática en mujeres durante el ciclo menstrual, donde las mayores concentraciones de AEA fueron medidas al momento de la ovulación sugiriendo una relación entre este endocannabinoide y el pico de E ovulatorio. Por otro lado, se ha demostrado en células endoteliales humanas que el E estimula la liberación de AEA mediante un incremento de la actividad de NAPE-PLD (enzima que sintetiza a AEA) y la inhibición de la actividad de FAAH (enzima que degrada AEA), apoyando la idea de una relación entre esta hormona y los niveles de AEA (Maccarrone y col., 2002a; Maccarrone y col., 2002b).

En bovinos, las mayores concentraciones de E plasmático y local producido por el folículo dominante se encuentran en el período peri-ovulatorio (Downey, 1980). Este estrógeno puede alcanzar el oviducto directamente desde las gónadas mediante la vasculatura (Hunter, 2012). Teniendo en cuenta esto, en nuestro modelo bovino los niveles de AEA podrían estar regulados por una influencia estrogénica directa sobre el oviducto y por ello los mayores niveles de AEA que detectamos fueron en los estadios que se corresponden con las mayores concentraciones de E circulante.

Nuestros resultados indicaron que también los niveles intracelulares de OEA y PEA fluctúan entre los distintos estadios del ciclo estral encontrándose los mayores niveles en los estadios peri-ovulatorios. Es interesante destacar que los niveles intracelulares de AEA correlacionaron positivamente con los de OEA y PEA, en cambio, en el fluido oviductal la concentración de

AEA correlacionó positivamente con la concentración de OEA. Cabe destacar que estas tres NAEs comparten las principales enzimas de síntesis (NAPE-PLD) y degradación (FAAH y NAAA) (Cravatt y col., 1996; Ueda y col., 2001; Okamoto y col., 2004) por lo tanto podríamos especular que la falta de correlación de AEA con PEA en el fluido oviductal se deba a la degradación diferencial dada por la enzima NAAA, ya que ha sido descrito que dicha enzima degrada principalmente PEA entre las NAEs (Ueda y col., 2001).

La presencia de AEA, OEA y PEA en el oviducto indican que un balance adecuado de estas moléculas es necesario para la correcta función oviductal. En nuestro laboratorio hemos demostrado la participación de la AEA como molécula inductora de la liberación de los espermatozoides del oviducto bovino. Sin embargo, aun no se han descrito las funciones que OEA y PEA cumplen en el oviducto bovino. Varios autores consideran que estas NAEs son compuestos que al ser liberados en conjunto con AEA ejercen un efecto potenciador de la vía de señalización que este endocannabinoide activa ya que previenen la degradación de la misma (Lambert y Di Marzo, 1999; McFarland y Barker, 2004). Por otra parte, se ha informado, en una línea celular embrionaria humana, que PEA incrementa la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por AEA mediante la activación de TRPV1 sin modificar el metabolismo de AEA (De Petrocellis y col., 2001a). En este sentido, la presencia de PEA en el oviducto bovino podría estar modulando las vías de señalización de AEA.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se midieron las concentraciones oviductales de AEA, OEA y PEA en bovinos. Es interesante además que la concentración oviductal de estas NAEs fluctúan entre los distintos estadios del ciclo estral sugiriendo un posible control endócrino sobre estas moléculas *in vivo*.

Se sabe que existen diferencias en la composición del fluido oviductal entre distintas regiones del oviducto en mamíferos y esto podría relacionarse a las distintas funciones que las mismas cumplen (Hunter 2012). Por ello, medimos los niveles de NAEs en células epiteliales del oviducto provenientes de la ampolla o del istmo. Los niveles de AEA no difieren entre la ampolla y el istmo, sin embargo los de OEA y PEA sí lo hacen. En nuestro laboratorio hemos demostrado que existe una respuesta diferencial a AEA entre la ampolla y el istmo en relación a la frecuencia del batido ciliar ya que encontramos que concentraciones nanomolares de AEA incrementan la frecuencia del batido ciliar en células epiteliales de la ampolla mientras que no tienen efecto en el istmo (datos no mostrados). Esta función diferencial dada por AEA puede deberse a que OEA y PEA son compuestos que modulan los efectos de este endocannabinoide al prevenir su degradación, y la concentración de los mismos varía entre la ampolla y el istmo. Otra posibilidad es que haya diferencias en la expresión de los receptores que puede activar AEA entre ambas regiones del oviducto.

Como se ha mencionado en la introducción, FAAH y NAPE-PLD son las principales enzimas de la vía metabólica de AEA, y su actividad y expresión determina las concentraciones locales de este ligando (Fezza y col., 2008).

Previamente, se ha informado que durante los primeros días de preñez la expresión diferencial de FAAH y NAPE-PLD entre distintas regiones del oviducto de ratón regula los niveles oviductales de AEA generando un tono de este endocannabinoide necesario para el correcto desarrollo embrionario y transporte oviductal (Wang y col., 2006c). Además, se ha demostrado que durante la preñez las enzimas NAPE-PLD y FAAH son las principales moduladoras de los niveles locales de AEA en células de la decidua de rata (Fonseca y col., 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes evaluamos si la fluctuación en los niveles de endocannabinoides y NAEs detectada a lo largo ciclo estral podría deberse a la modulación de la expresión de las principales enzimas del metabolismo de estas moléculas en oviductos del lado ipsilateral.

En este trabajo demostramos que el oviducto bovino expresa NAPE-PLD y FAAH y que ambas enzimas se localizan principalmente en el epitelio y en la capa muscular tanto de la ampolla como del istmo oviductal. Sin embargo no encontramos variación en la expresión de estas proteínas en el oviducto a lo largo de las distintas regiones y estadios del ciclo estral evaluados.

En concordancia con estos resultados, el grupo de Gebbeh y col. (2012) recientemente reportó que las enzimas NAPE-PLD y FAAH se localizan en las células epiteliales de las trompas de Fallopio y su expresión no varía a lo largo del ciclo menstrual de la mujer.

Por otro lado, la diferencia en la expresión de las enzimas encontrada con los resultados del grupo de Wang y col. (2006) en oviducto de ratón puede deberse a que estos estudios fueron realizados en hembras durante la preñez temprana, lo que implica un estado fisiológico distinto dado por una diferente influencia hormonal.

Si bien en este trabajo no encontramos variación en la actividad de FAAH en el oviducto bovino, no podemos descartar que sea la actividad de la NAPE-PLD la que esté regulada a lo largo del ciclo estral.

En conjunto, teniendo en cuenta los resultados hasta aquí expuestos, las fluctuaciones observadas en las concentraciones de AEA, OEA y PEA no ocurren por regulación de la expresión de las enzimas FAAH o NAPE-PLD; sin embargo no podemos descartar que se deba a una regulación post-traducciona de estas enzimas o a la posible regulación de otras de las vías del metabolismo descriptas para estas moléculas.

Se ha demostrado que los niveles uterinos de AEA requeridos para una implantación exitosa en ratones se encuentran principalmente regulados por la expresión espaciotemporal del mensajero de NAPE-PLD y la actividad de esta enzima en útero (Guo y col., 2005). Además, si bien NAPE-PLD y FAAH son las principales enzimas del metabolismo de AEA y otras NAEs, otras enzimas tales como COX-2 o NAAA son vías alternativas que podrían degradar a estas moléculas y modular los niveles de AEA en el oviducto bovino.

Otra posibilidad es que cambie la disponibilidad de las moléculas precursoras para la síntesis de estos endocannabinoides durante el ciclo estral. Se han informado cambios en los niveles de AEA y OEA debido a cambios en la disponibilidad de sus precursores y no a la variación en la expresión y actividad de las enzimas de síntesis y degradación de estos compuestos en intestino de ratas (Petersen y col 2006). A partir de estos resultados, estos autores proponen que el remodelado de la composición de precursores de NAPE es un mecanismo importante de control de los niveles y la formación de diferentes especies de NAEs.

Como se ha mencionado en la introducción, el fluido oviductal está compuesto por distintos componentes, entre ellos: secreciones de las células epiteliales del oviducto, componentes provenientes del plasma sanguíneo que ingresan por trasudación (Leese, 1988; Mondejar y col., 2012) o componentes del fluido folicular que ingresan al momento de la ovulación (Hansen y col., 1991). Estos hechos, junto con los datos que indican que la entrada de productos de la ovulación a la ampolla oviductal podrían desencadenar la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal (Hunter, 2012), nos llevaron a medir los niveles de AEA en el fluido folicular de folículos ovulatorios. Nuestros resultados indicaron que el fluido folicular bovino contiene concentraciones nanomolares de AEA, siendo las mismas mayores a las encontradas en el fluido oviductal. Esto indica que es probable que al momento de la ruptura del folículo ovulatorio, parte del fluido folicular ingrese al oviducto junto con el complejo cúmulo-oocito incrementando de esta manera la concentración de AEA oviductal en el momento de la ovulación. Estos resultados concuerdan con los informados por Schuel y col. (2002) en los que encontraron niveles nanomolares de AEA en fluido oviductal y fluido folicular en mujeres en mitad del ciclo menstrual (momento peri-ovulatorio) sugiriendo que existe una regulación fina de los niveles de endocannabinoides que es crucial para eventos relacionados a la fecundación, especialmente en lo relacionado a la funcionalidad de las gametas dentro del tracto reproductor (Schuel y col., 2002a).

Hasta aquí, nuestros resultados sugieren que los niveles de AEA podrían estar controlados por las hormonas ováricas durante el ciclo estral bovino, y ésta podría ser una forma de regulación de la liberación de los espermatozoides del oviducto. Por lo tanto nos propusimos



estudiar la relación entre las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.

Previamente hemos demostrado que tanto las CEO como los espermatozoides bovinos expresan los receptores CB1, CB2 y TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). En este trabajo demostramos que los espermatozoides bovinos expresan las proteínas NAPE-PLD y FAAH. Estas enzimas fueron previamente descritas en espermatozoides de otras especies tales como humanos, cerdos, ratón y sapo (Maccarrone y col., 2005; Cobellis y col., 2006; Francavilla y col., 2009; Catanzaro y col., 2011). Además, la enzima NAPE-PLD se localiza en la cuña del acrosoma, en la región post-acrosomal, en el cuello y en la cola del espermatozoide. Esta localización es similar a la descrita previamente en espermatozoides de otras especies ya que por ejemplo en humanos NAPE-PLD se localiza en la región post-acrosomal, cuello y pieza media (Francavilla y col., 2009), mientras que en ratones se localiza en la cola (Catanzaro y col., 2011). Para el caso de FAAH, nuestros resultados indican que esta enzima se localiza principalmente en la cuña del acrosoma, la región post-acrosomal y en la pieza media del espermatozoide bovino. Esta localización también es similar a la descrita para esta enzima en espermatozoides de otras especies como ser en cerdos y en humanos FAAH se localiza en la región post-acrosomal y en la pieza media (Maccarrone y col., 2005; Francavilla y col., 2009); mientras que en ratones se encuentra en todo el espermatozoide (Catanzaro y col., 2011). Estas evidencias sugieren que estas enzimas podrían tener una participación esencial en la función espermática, como la motilidad y la capacitación.

Por otro lado, los estudios de inmunohistoquímica indicaron que los cultivos primarios de CEO también expresan las proteínas NAPE-PLD y FAAH, las cuales se localizan principalmente en la región perinuclear y en el citoplasma respectivamente.

La NAPE-PLD ha sido principalmente asociada a la membrana plasmática donde están los precursores de AEA que son clivados (Okamoto y col., 2004). Sin embargo, la localización de la proteína NAPE-PLD en la región peri-nuclear, ha sido previamente descrita en placenta y decidua de rata (Fonseca y col., 2009; Fonseca y col., 2010), en ovarios de humanos (El-Talatini y col., 2009a) y en trofoblasto y decidua de humanos (Taylor y col., 2011). Esta localización particular podría explicarse teniendo en cuenta que recientemente se ha demostrado que la AEA puede ser almacenada intracelularmente en adiposomas los cuales estan asociados a las enzimas del metabolismo de AEA (Maccarrone y col., 2010).

Una vez determinado que los niveles oviductales de AEA fluctúan a lo largo del ciclo estral en bovinos, y teniendo en cuenta que este endocannabinoide participa en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal en bovinos, nos propusimos estudiar la relación entre

las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.

Nuestros resultados indicaron que las hormonas ováricas inducen la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino. Estos resultados se corresponden con los informados previamente en cerdos y aves en los que la P está involucrada en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal (Bureau y col., 2002; Ito y col., 2011).

Previamente demostramos que los receptores CB1 y/o TRPV1 participan en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal inducida por AEA (Gervasi y Perez Martinez, 2007). Para estudiar la posible interacción entre el sistema endocannabinoide y las hormonas ováricas se realizaron experimentos de liberación con las hormonas en presencia de antagonistas de los receptores CB1 y TRPV1. Los resultados indicaron que el efecto del E es revertido tanto por la incubación con el antagonista de CB1 como con el antagonista de TRPV1, sugiriendo que el E estaría activando una vía que favorece la activación de estos receptores. En principio, estas evidencias sugieren que el E podría estar incrementando los niveles de AEA, y la misma activar a los receptores CB1 y/o TRPV1 induciendo la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.

Existen vastas evidencias que indican que el E es un modulador de los niveles de AEA a través de la regulación de las principales enzimas del metabolismo de la misma. Por ejemplo, en células endoteliales de humanos el E induce un aumento de los niveles de AEA mediante la activación de la enzima NAPE-PLD y la inhibición de la enzima FAAH (Maccarrone y col., 2002a). Mientras que en útero de roedores se observó que el E disminuye la expresión y la actividad de FAAH siendo consistente con el hecho de que el promotor del gen de FAAH posee un elemento regulador de respuesta a estrógenos (Maccarrone y col., 2000a; Puffenbarger, 2005).

Por otro lado, la acción de la P sobre la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino no parecería estar mediada por AEA ya que los antagonistas utilizados no revirtieron significativamente el efecto de la hormona. Esto sugiere que la P podría estar induciendo la liberación de los espermatozoides del oviducto mediante un mecanismo de acción alternativo que no involucra a la AEA.

En espermatozoides humanos la P activa diversas vías moleculares las cuales involucran incremento de  $\text{Ca}^{2+}$ , aumento de fosforilación en tirosinas, eflujo de iones  $\text{Cl}^-$ , e incremento de AMPc (Losel y Wehling, 2003; Harper y col., 2004; Luconi y col., 2004; Baldi y col., 2009). Recientemente se ha descrito que la P incrementa los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides mediante la activación de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  específicos denominados CatSper (Strunker y col., 2011). Además, la P promueve la hiperactivación de los espermatozoides de humanos y

hámster (Yang y col., 1994). Por lo tanto, en nuestro modelo la P podría estar induciendo un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a través de los receptores CatSper, hiperactivar la motilidad de los espermatozoides y favorecer la liberación de los mismos del epitelio oviductal.

La incubación con E y P en forma simultánea también indujo la liberación de los espermatozoides de las CEO, y parecería predominar el efecto de P ya que no hubo una completa reversión de la liberación cuando se incubó con antagonistas de CB1 o TRPV1. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la concentración de hormonas utilizada en este trabajo es una aproximación a la que se encuentra en el momento peri-ovulatorio en el fluido oviductal *in vivo*. La concentración de E utilizada es la descrita en el suero bovino en el momento peri-ovulatorio, por lo que los niveles oviductales de E *in vivo* podrían ser más elevados que los utilizados para realizar estos experimentos dada la producción local de esta hormona (Hunter, 2012).

Por su parte, el E podría estar regulando la actividad de NAPE-PLD y/o FAAH que están presentes en el epitelio oviductal bovino o en los espermatozoides, induciendo de esta manera un aumento local de los niveles de AEA.

En concordancia con los resultados encontrados a lo largo del ciclo estral, el análisis de la expresión del mensajero de estas enzimas en cultivos de CEO incubados con las hormonas ováricas no arrojó diferencias entre los tratamientos.

Por otro lado, tampoco se encontraron diferencias en la producción de AEA tanto en cultivos de CEO como en espermatozoides en presencia de las hormonas ováricas. Sin embargo hay que tener en cuenta que es posible que haya cambios locales y mínimos en la producción de AEA que no sean detectables por la técnica de medición de AEA utilizada en este trabajo. Por ejemplo, en el útero de ratón se ha demostrado que existen diferencias significativas en las concentraciones de AEA entre regiones adyacentes como son los sitios y los intersitios de implantación (Wang y col., 2006b).

Además, como se ha mencionado en la introducción, la presencia de espermatozoides en el oviducto puede cambiar el patrón de expresión y secreción del mismo (Aldarmahi y col., 2012). Teniendo esto en cuenta, es probable que la unión de los espermatozoides a las CEO cambie el patrón de expresión y secreción de las mismas favoreciendo la producción local de AEA en respuesta a las hormonas ováricas. Por lo tanto, experimentos adicionales de medición de AEA en co-cultivos tratados con hormonas se requieren para confirmar nuestra hipótesis.

Debido a que en los últimos años se ha informado la presencia de receptores de E en espermatozoides de mamíferos (Naz y Sellamuthu, 2006), otra posibilidad es que el incremento de E que ocurre en el oviducto en el momento peri-ovulatorio esté actuando directamente sobre los espermatozoides que se encuentran unidos a las CEO induciendo un

aumento de la producción de AEA por parte de los mismos. En este sentido los niveles de AEA medidos *in vitro* en espermatozoides fue un orden mayor que en CEO, sugiriendo que el aporte de AEA espermático puede ser importante en el proceso de interacción.

El fluido oviductal en el que están inmersos los espermatozoides varía de acuerdo al momento del ciclo estral (Killian, 2011), y en el presente trabajo demostramos que la concentración de AEA oviductal es máxima en el momento peri-ovulatorio. La presencia de NAEs en el fluido oviductal bovino y la presencia de los receptores CBs y TRPV1 en el espermatozoide de toro sugieren que las vías de señalización de estas moléculas están involucradas en el proceso de selección espermática que ocurre en el oviducto en el momento peri-ovulatorio. Por lo tanto, el siguiente paso consistió en evaluar el mecanismo de acción de la AEA en el proceso de liberación de los espermatozoides de las CEO.

Previamente demostramos que el agregado de AEA exógeno induce la liberación de los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y/o TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). En este trabajo demostramos que el incremento de AEA endógena, a través de la inhibición de la enzima FAAH, induce la liberación de los espermatozoides de las CEO mediante la activación de los receptores CB1 y TRPV1 correspondiéndose con los resultados previos obtenidos con el agregado de agonistas exógenos. Además, determinamos que es necesaria la activación de ambos receptores para que AEA ejerza su efecto en la liberación de los espermatozoides. Esto se deduce del hecho que la incubación con un agonista selectivo de TRPV1 junto con un antagonista selectivo de CB1 inhibió completamente la liberación de los espermatozoides de las CEO.

La activación de los receptores TRPV1 se encuentra altamente regulada. En particular se conoce que la actividad de TRPV1 puede estimularse por fosforilación catalizada por PKC, y puede inhibirse tónicamente por PIP<sub>2</sub> (Premkumar y Ahern, 2000; Chuang y col., 2001; De Petrocellis y col., 2001b; Vellani y col., 2001). En este sentido, es interesante destacar que los receptores CB1 se encuentran acoplados a la activación de la enzima PLC (Ho y col., 1999) y que la activación de los TRPV1 puede ser modulada por la activación de los receptores CB1, especialmente en células donde se co-expresan ambos receptores (Hermann y col., 2003).

Previamente demostramos que tanto las CEO como los espermatozoides bovinos co-expresan los receptores CB1 y TRPV1 (Gervasi y Perez Martinez, 2007). Los resultados hasta aquí expuestos indican que es necesaria la activación de ambos receptores en el proceso de liberación, por lo tanto decidimos evaluar la interacción de las vías de señalización entre estos dos receptores en este proceso.

En el presente trabajo demostramos que el mecanismo de acción de CB1 y de TRPV1 depende de la activación de una PLC. En primer lugar demostramos que la incubación con un

inhibidor de esta enzima previno el efecto del agonista selectivo de TRPV1 (capsaicina) y del agonista selectivo de CB1 (ACEA) en la liberación de los espermatozoides de las CEO. Además la inducción de la liberación espermática por la co-incubación con capsaicina y ACEA fue revertida completamente por la incubación con el inhibidor de PLC. A su vez, la presencia de un activador de la enzima PLC indujo la liberación de los espermatozoides de las CEO. En conjunto estos resultados indican que una PLC es necesaria para la activación de los receptores TRPV1 y CB1 y este mecanismo de acción supone además una activación secuencial de CB1 y TRPV1 en nuestro sistema.

Estos resultados concuerdan con modelos de activación secuencial de CB1-TRPV1 propuestos previamente en otros sistemas *in vitro*. Herman y col. (2003) reportaron en células HEK-293 que al encontrarse activada la vía de AMPc la activación de CB1 estimula a la PLC con la consecuente activación de TRPV1; el grupo de Evans y col. (2007) informó en cultivos de neuronas sensitivas que la exposición de los cultivos a altas concentraciones del factor de crecimiento NGF produce que la activación de CB1 estimule el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por la activación de TRPV1; mientras que el grupo de Tsumura y col. (2012) informó que la AEA activa a CB1, estimula un incremento de AMPc e induce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  mediada por TRPV1 en odontoblastos de rata.

Además, la idea de una activación secuencial de estos receptores se ve apoyada por el hecho de que el sitio de unión de AEA es extracelular para CB1 e intracelular para TRPV1. De esta manera la AEA extracelular primero activaría a CB1 y luego ingresaría a las células y podría activar a TRPV1 (Hermann y col., 2003).

Una posible causa de la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal es el influjo de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  a los espermatozoides desde el endosalpinx que ocurre en el momento peri-ovulatorio (Petrunkina y col., 2001). Sin embargo, aun se requiere identificar canales de iones específicos que sean activados en el espermatozoide durante el período peri-ovulatorio (Hunter, 2008). Nuestros resultados indican por primera vez la activación de un canal de cationes no selectivo, como es el TRPV1 en el proceso de liberación de los espermatozoides. En general, la activación de estos receptores implica un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Ross, 2003). Por lo tanto evaluamos la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  como parte del mecanismo de acción de AEA en la liberación de los espermatozoides de las células epiteliales del oviducto.

Las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  pueden cambiar órdenes de magnitud en tiempos cortos causando, de manera inmediata, la activación de proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  con sus consecuentes respuestas celulares (Jimenez-Gonzalez y col., 2006). En este sentido las vías de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  son importantes para la adecuada función espermática. En el presente trabajo demostramos, mediante la utilización del quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular BAPTA2-AM,

que un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides es necesario para que ocurra la liberación de los mismos inducida por AEA. En concordancia con estos resultados, Gualtieri y col. (2005) demostraron que los espermatozoides de toro liberados con heparina, un análogo de los glicosaminoglicanos presentes en el oviducto de bovinos, contienen mayores niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular respecto a los unidos al epitelio oviductal. Además, trabajos previos realizados en caballos demostraron que la adhesión de los espermatozoides a las CEO mantiene bajas las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, y que los espermatozoides liberados espontáneamente presentan concentraciones mayores de este ion respecto a los unidos (Dobrinski y col., 1996b; Dobrinski y col., 1997).

Debido a que los resultados con el quelante de  $\text{Ca}^{2+}$  nos indicaban que este ion forma parte del mecanismo de acción de AEA en la liberación, el siguiente paso consistió en determinar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en espermatozoides en co-cultivo con CEO en presencia de los distintos agonistas cannabinoides. Los resultados indicaron que, aproximadamente un 40% de los espermatozoides unidos a las CEO incrementan los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular respecto al basal en todos los tratamientos incluidos los controles. Sin embargo, el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  fue significativamente mayor en los espermatozoides tratados con agonistas cannabinoides respecto a los controles.

Los resultados que indican que una subpoblación de espermatozoides unidos a las CEO incrementó los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$ , concuerdan con los obtenidos previamente en los que demostramos que aproximadamente un 40% de los espermatozoides unidos a las CEO son liberados con el tratamiento con AEA a concentraciones nanomolares (Gervasi y col., 2009). En relación a esto, se sabe que la población de espermatozoides presentes en un eyaculado es heterogénea y por lo tanto los distintos procesos fisiológicos que éstos atraviesan no ocurren de manera sincronizada dentro de la población (Florman, 2006). El hecho de que únicamente una subpoblación responda a la incubación con agonistas cannabinoides indica que este podría ser parte de un proceso regulatorio de selección secuencial que mantenga durante cierto tiempo un bajo número de espermatozoides con capacidad fecundante liberados facilitando el encuentro de éstos con el oocito.

Al igual que en los experimentos de liberación, el agregado exógeno de AEA y el incremento endógeno de la misma tuvieron el mismo efecto, induciendo un aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de los espermatozoides unidos a las CEO.

En general, ha sido ampliamente informado que la activación de los receptores TRPV1 induce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en distintos tipos celulares (Ross, 2003). En cambio, la activación de los receptores CB1 se encuentra asociada a la inhibición de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Demuth y Molleman, 2006). Nuestros resultados indicaron que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los



espermatozoides en co-cultivo está mediado por la activación de los receptores CB1 y TRPV1 ya que la incubación con antagonistas de estos receptores previno el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  dado por AEA. En concordancia con estos resultados, recientemente se ha demostrado en odontoblastos de rata que la activación de los receptores CB1 incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y este efecto es revertido por la incubación con un antagonista de TRPV1, indicando que el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado por TRPV1 se encuentra acoplado a la activación de CB1 (Tsumura y col., 2012). Además, Launckner y col. (2005) demostraron que un agonista cannabinoide incrementa el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular via CB1 en células embrionarias de riñón.

Los receptores TRPV1 pueden ser blanco de fosforilación ya que poseen dominios de repetición de anquirinas en su extremo amino terminal (O'Neil y Brown, 2003). La sensibilidad de estos receptores a diferentes ligandos puede verse potenciada por componentes que estimulan a la adenilato ciclasa y subsecuentemente activan a la PKA dependiente de AMPc la cual puede fosforilar a TRPV1 (De Petrocellis y col., 2001b). Es sabido que la activación de los receptores CB1 tiene un efecto dual sobre la adenilato ciclasa dependiendo del tipo celular (Glass y Felder, 1997; McAllister y Glass, 2002; Jarrahian y col., 2004). Por ello, adicionalmente al mecanismo de acción de AEA mediado por PLC y  $\text{PIP}_2$  propuesto anteriormente, podríamos especular que la activación de los receptores CB1 de los espermatozoides en nuestro sistema activa a la vía de AMPc/PKA que finalmente podría fosforilar a TRPV1 y promover su activación permitiendo el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula.

En los últimos años diversos trabajos reportaron la existencia de al menos 2 reservorios de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides, dando idea de la maquinaria relativamente compleja de señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  que poseen estas células (Jimenez-Gonzalez y col., 2006). Para evaluar si el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  observado con AEA y capsaicina se debía al ingreso de este ion desde el espacio extracelular, se midieron los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en espermatozoides en co-cultivo en presencia de un bloqueador no selectivo de canales iónicos. El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  que se observó con estos agonistas fue inhibido al bloquear inespecíficamente los canales iónicos. Esto apoya la idea de que el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que ocurre por la activación de los receptores CB1 y TRPV1 se debe a la entrada de este ion desde el espacio extracelular. Estos resultados concuerdan con los descritos previamente por Petrunkina y col. (2001) que indican que un influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el endosalpinx es necesario para la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal en equinos.

El incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en los espermatozoides es un evento que se encuentra estrechamente relacionado con la capacitación espermática (Visconti, 2009). El proceso de capacitación promueve la remoción de las proteínas BSP de los espermatozoides y podría inducir la liberación de los mismos del reservorio oviductal (Hung y Suarez, 2012). Debido a

que nuestros resultados indican que la AEA es una molécula inductora de la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal a través de un mecanismo que involucra un incremento del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides, nos propusimos evaluar la posible participación de la AEA en distintos eventos relacionados a la capacitación espermática.

En el presente trabajo demostramos por primera vez que concentraciones fisiológicas de AEA inducen algunos de los eventos asociados a la capacitación espermática en bovinos. La participación de este endocannabinoide en la capacitación espermática quedó demostrada con un aumento del porcentaje de espermatozoides que presentaron patrón B de capacitación por la técnica de CTC, así como también por el incremento de los niveles de fosforilación en residuos tirosina en las proteínas de espermatozoides tratados. Además, nuestros resultados indican que los espermatozoides que fueron incubados con AEA incrementaron su habilidad de reaccionar frente a un inductor de la reacción acrosomal como es el LPC, apoyando nuevamente la idea de que este endocannabinoide actúa como un agente capacitante en bovinos. Estos resultados concuerdan con los previamente demostrados por nuestro grupo de trabajo en el que la pre-incubación de espermatozoides con concentraciones nanomolares de AEA inhibe la unión de los mismos a las CEO (Gervasi y col., 2009), sugiriendo que este endocannabinoide podría inducir cambios estructurales y/o bioquímicos, asociados a la capacitación espermática, en los espermatozoides impidiendo la unión de los mismos al epitelio oviductal. Además la incubación de espermatozoides bovinos criopreservados con concentraciones nanomolares de Met-AEA induce un incremento en los niveles de óxido nítrico (Oszycka-Salut y col., 2012), asociando nuevamente a la AEA con vías moleculares que se activan durante la capacitación espermática.

Se ha descripto previamente que algunas moléculas inductoras de la liberación de los espermatozoides del oviducto actúan como catalizadores de la capacitación. Del mismo modo que la AEA, los glicosaminoglicanos sulfatados son inductores de la capacitación espermática en bovinos y además promueven la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal (Parrish y col., 1988; Talevi y Gualtieri, 2001).

Por otro lado, el grupo de Adeoya-Osiguwa y col. (2003) demostró que el E induce la capacitación en espermatozoides de ratones por un mecanismo aun desconocido que podría involucrar incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Adeoya-Osiguwa y col., 2003). En nuestro modelo, es posible especular que el E podría inducir un aumento de AEA, y que la misma active los receptores CB1 y TRPV1 de los espermatozoides promoviendo la liberación de los mismos mediante la inducción de eventos relacionados a la capacitación espermática.

La AEA estimula la capacitación espermática en bovinos a través de la activación de CB1 y TRPV1 debido a que los efectos de este endocannabinoide fueron completamente revertidos



con la incubación con antagonistas de estos receptores. En cambio, un antagonista de CB2 no revirtió el efecto de AEA en la capacitación espermática por lo tanto los receptores CB2 no estarían involucrados en este proceso (datos no mostrados en este trabajo de tesis). Estos resultados coinciden con resultados previos de nuestro laboratorio en los que demostramos que la AEA inhibe el pegado e induce la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal a través de la activación de los receptores CB1 y TRPV1 pero no CB2 (Gervasi y Perez Martinez, 2007; Gervasi y col., 2009). Además, los receptores CB1 pero no los CB2 han sido asociados a microdominios de membrana especiales denominados “*lipid rafts*” y esta asociación modula las vías de señalización de CB1 (Battista y col., 2012). Se conoce que la relación funcional entre CB1 y los dominios de membrana es afectada por el contenido de colesterol de las células. En particular, se ha demostrado que un enriquecimiento de colesterol en las membranas de células pertenecientes a líneas celulares o cultivos primarios reduce la activación de CB1 y sus vías de señalización (Bari y col., 2005b). La superficie de la membrana de los espermatozoides se encuentra organizada en estos dominios lipídicos y se ha demostrado que cambian su organización y composición durante la capacitación espermática (Travis y Kopf, 2002; Gadella y col., 2008). Además, durante la capacitación espermática hay un remodelado de la membrana plasmática en el que, entre otros eventos, ocurre una pérdida de colesterol otorgándole fluidez a la misma (Tapia y col., 2012). En este sentido, los receptores CB1 podrían estar localizados en microdominios de membrana en los espermatozoides bovinos, y la AEA mediante la activación de los mismos podría inducir la capacitación espermática con el consecuente remodelado de la membrana como un posible mecanismo de regulación de las vías de activación de estos receptores.

Nuestros resultados indicaron también que la AEA actúa a través de TRPV1 en la capacitación espermática, hecho que es consistente con el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  durante este proceso (Visconti y col., 1995a) y con el incremento en el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular observado en los espermatozoides liberados del epitelio (Petrunkina y col., 2001).

Además, el incremento endógeno de AEA, mediante la inhibición de la enzima FAAH, también induce un incremento del porcentaje de espermatozoides capacitados, vía la activación de los receptores CB1 y TRPV1. Debido a que el sitio de unión de AEA en los receptores CB1 es extracelular, nuestros resultados de capacitación *in vitro* sugieren que la AEA endógena que se acumula debido a la inhibición de la enzima FAAH puede salir de las células y activar ya sea autócrina o parácrinamente a los espermatozoides e inducir la capacitación de los mismos. Si bien se cree que la AEA puede atravesar las membranas libremente debido a su característica lipídica, varios autores proponen la existencia de un transportador de este endocannabinoide que regula el pasaje de esta molécula a través de las membranas que aun

no ha sido clonado (Battista y col., 2012). Recientemente, en células neurales ha sido identificada una versión truncada de FAAH, denominada FLAT, cuya función sería la del transporte de AEA (Fu y col., 2011). Si bien nuestros resultados sugieren que la AEA puede salir de los espermatozoides, aun no existen reportes de la existencia de un transportador de esta molécula en espermatozoides.

El sistema endocannabinoide está relacionado con el sistema reproductor masculino, modulando diferentes aspectos involucrados en la maduración espermática y la adquisición de la capacidad fecundante (Maccarrone y col., 2005; Wang y col., 2006a; Battista y col., 2008).

Por ejemplo, la pérdida genética de FAAH resulta en elevados niveles de AEA en el sistema reproductor masculino que comprometen la capacidad fecundante en ratones (Sun y col., 2009).

Además, varios de los trabajos realizados con endocannabinoides y espermatozoides *in vitro* sugieren que la AEA es una molécula que atenúa la función espermática, inhibiendo la motilidad, la capacitación y la reacción acrosomal en espermatozoides de humanos y cerdos (Maccarrone y col., 2005; Battista y col., 2008; Francavilla y col., 2009; Aquila y col., 2010). Sin embargo, las concentraciones de AEA y sus análogos utilizadas en estos trabajos son del orden micromolar y por lo tanto representan efectos farmacológicos o recreacionales de este endocannabinoide. En este trabajo de tesis los efectos observados se obtuvieron utilizando concentraciones de AEA similares a las concentraciones que detectamos de este endocannabinoide en el oviducto bovino.

En conjunto, estas evidencias indican que es necesaria una fina regulación del sistema endocannabinoide para mantener la capacidad fecundante de los espermatozoides, apoyando la idea previamente expuesta de que la utilización de concentraciones elevadas de AEA no es representativa de eventos fisiológicos.

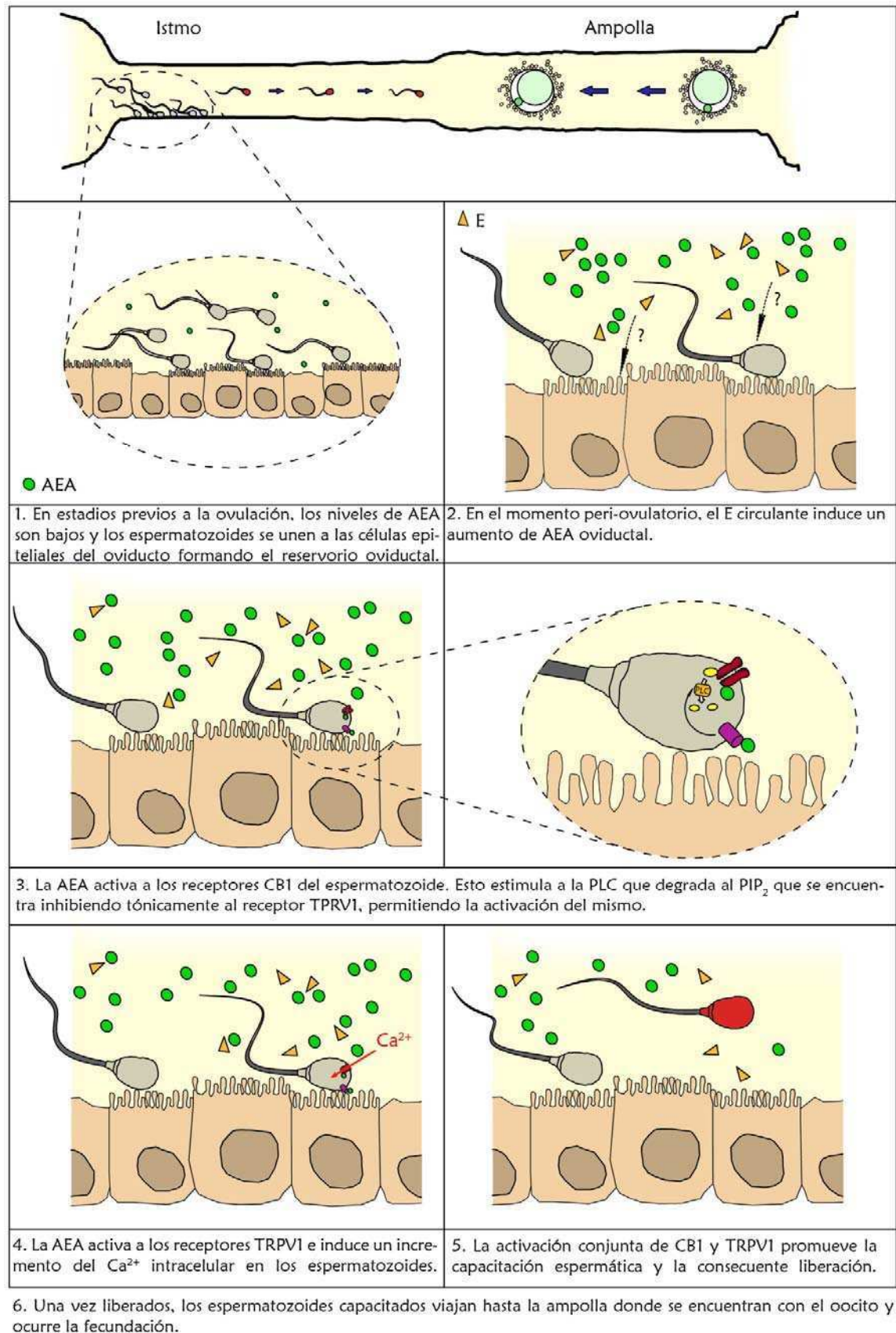
Se sabe que una de las funciones del oviducto es la de seleccionar espermatozoides de alta calidad y con capacidad fecundante (Killian, 2011). Por ello, a fin de establecer la posible relevancia de la AEA como inductor fisiológico de la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal, evaluamos distintos parámetros de funcionalidad espermática en la población total de espermatozoides liberados con este endocannabinoide.

Como fue mencionado en la introducción, la adhesión a las células epiteliales del oviducto es un mecanismo clave en la selección de subpoblaciones de espermatozoides con alta calidad (Holt y Fazeli, 2010). Parámetros tales como el estado acrosomal, la capacitación, la viabilidad y la motilidad son marcadores de la potencial funcionalidad de los espermatozoides. El análisis de estos parámetros en los espermatozoides liberados indicó que la liberación inducida por AEA no modifica el proceso de selección oviductal en cuanto al porcentaje de

espermatozoides que presentan el acrosoma intacto y el estado capacitado entre los liberados. Tampoco hay diferencias en la viabilidad de los espermatozoides liberados entre los controles y los tratados. En cambio, la población de espermatozoides liberada con AEA presentó un mayor porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva respecto a la población de espermatozoides liberados control. Estos resultados sugieren que la AEA, además de actuar como molécula inductora de la liberación, participa en el mantenimiento de la motilidad espermática. En concordancia con estos resultados, en nuestro laboratorio hemos demostrado que la incubación de espermatozoides con concentraciones nanomolares de AEA tiene un efecto en el mantenimiento de la motilidad progresiva de los espermatozoides respecto a los controles en los cuales la motilidad decrece a lo largo del tiempo (datos no mostrados).

El modelo actual propuesto por el grupo de Suarez y col. que explica la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal en bovinos implica un mecanismo dinámico y complejo que está estrechamente relacionado a la capacitación espermática y el remodelado de la membrana plasmática que ocurre durante este proceso (Coy y col., 2012; Hung y Suarez, 2012). En este sentido, la AEA podría incorporarse a este modelo como una de las moléculas inductoras de la capacitación espermática que promueva cambios en las proteínas BSP presentes en la cabeza de los espermatozoides y, de esta manera, inducir la liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal en bovinos contribuyendo al proceso de selección espermática *in vivo*. Futuros estudios son necesarios para corroborar esta hipótesis.

En resumen, en el presente trabajo se demostró que la AEA es una molécula que está presente en el oviducto bovino y que sus niveles varían a lo largo del ciclo estral posiblemente por la influencia estrogénica. La mayor concentración de este endocannabinoide se encontró en los estadios peri-ovulatorios, y los resultados indicaron que esta molécula estaría actuando como un inductor fisiológico de la capacitación espermática y la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal mediante un mecanismo que involucra el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  y la activación conjunta de los receptores CB1 y TRPV1 mediada por PLC (Figura 47).



**Figura 47.** Modelo propuesto para la liberación de los espermatozoides inducida por AEA.

- El oviducto bovino contiene AEA y otras NAEs, como OEA y PEA; los niveles de las mismas fluctúan a lo largo del ciclo estral y según el lado del oviducto respecto al sitio de la ovulación.
- Tanto el oviducto como los espermatozoides bovinos expresan a las enzimas del metabolismo de la AEA.
- El fluido folicular bovino contiene concentraciones nanomolares de AEA.
- Las hormonas ováricas participan en la liberación de los espermatozoides del oviducto, siendo el estradiol la hormona involucrada en el mecanismo de activación de los receptores CB1 y TRPV1.
- La activación conjunta de los receptores CB1 y TRPV1 por AEA es necesaria para inducir la liberación de los espermatozoides de las CEO.
- La AEA incrementó la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en los espermatozoides unidos a las CEO a través de la activación de los receptores CB1 y TRPV1.
- La enzima PLC participa en el mecanismo de acción de los receptores CB1 y TRPV1 en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.
- La AEA está involucrada en la inducción de la capacitación espermática *in vitro* a través de los mismos receptores.
- La AEA indujo la liberación de una población de espermatozoides capacitados y con motilidad progresiva.

*En bovinos, la AEA estaría participando en el mecanismo de selección espermática de los espermatozoides que ocurre en el oviducto en el momento periovulatorio ya que favorece la liberación del reservorio oviductal de una población de espermatozoides capacitados y con motilidad progresiva, dos eventos importantes en la adquisición de la capacidad fecundante.*

La comprensión del mecanismo molecular que regula estos procesos podría favorecer el desarrollo de métodos alternativos para mejorar la selección fisiológica del espermatozoide en

las técnicas de biotecnología de la reproducción en la especie bovina y tomarse como punto de partida para mejorar la selección de los espermatozoides en las técnicas de reproducción asistida en humanos.



- Aban, C. y col. (2013). "Differential expression of endocannabinoid system in normal and preeclamptic placentas: effects on nitric oxide synthesis." *Placenta* **34**(1): 67-74.
- Adeoya-Osiguwa, S. A. y col. (2003). "17beta-Estradiol and environmental estrogens significantly affect mammalian sperm function." *Hum Reprod* **18**(1): 100-7.
- Agirregoitia, E. y col. (2010). "The CB(2) cannabinoid receptor regulates human sperm cell motility." *Fertil Steril* **93**(5): 1378-87.
- Aldarmahi, A. y col. (2012). "Characterisation of an in vitro system to study maternal communication with spermatozoa." *Reprod Fertil Dev* **24**(7): 988-98.
- Amoako, A. A. y col. (2010). "Quantitative analysis of anandamide and related acylethanolamides in human seminal plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **878**(31): 3231-7.
- Apichela, S. A. y col. (2010). "Lectin binding patterns and carbohydrate mediation of sperm binding to llama oviductal cells in vitro." *Anim Reprod Sci* **118**(2-4): 344-53.
- Aquila, S. y col. (2010). "Rimonabant (SR141716) induces metabolism and acquisition of fertilizing ability in human sperm." *Br J Pharmacol* **159**(4): 831-41.
- Ardon, F. y col. (2008). "Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo." *Reproduction* **135**(4): 461-70.
- Austin, C. R. (1951). "Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg." *Aust J Sci Res B* **4**(4): 581-96.
- Austin, C. R. (1952). "The capacitation of the mammalian sperm." *Nature* **170**(4321): 326.
- Aviles, M. y col. (2010). "Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs?" *Mol Hum Reprod* **16**(12): 896-906.
- Baldi, E. y col. (2009). "Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions." *Mol Cell Endocrinol* **308**(1-2): 39-46.
- Bari, M. y col. (2005a). "Lipid rafts control signaling of type-1 cannabinoid receptors in neuronal cells. Implications for anandamide-induced apoptosis." *J Biol Chem* **280**(13): 12212-20.
- Bari, M. y col. (2011). "The manifold actions of endocannabinoids on female and male reproductive events." *Front Biosci* **16**: 498-516.
- Bari, M. y col. (2005b). "Cholesterol-dependent modulation of type 1 cannabinoid receptors in nerve cells." *J Neurosci Res* **81**(2): 275-83.
- Battista, N. y col. (2012). "The endocannabinoid system: an overview." *Front Behav Neurosci* **6**: 9.
- Battista, N. y col. (2008). "Regulation of male fertility by the endocannabinoid system." *Mol Cell Endocrinol* **286**(1-2 Suppl 1): S17-23.
- Bergqvist, A. S. y H. Rodriguez-Martinez (2006). "Sulphated glycosaminoglycans (S-GAGs) and syndecans in the bovine oviduct." *Anim Reprod Sci* **93**(1-2): 46-60.
- Bernabo, N. y col. (2010). "Role of TRPV1 channels in boar spermatozoa acquisition of fertilizing ability." *Mol Cell Endocrinol* **323**(2): 224-31.
- Boatman, D. E. (1997). "Responses of gametes to the oviductal environment." *Hum Reprod* **12**(11 Suppl): 133-49.
- Bornheim, L. M. y col. (1995). "Microsomal cytochrome P450-mediated liver and brain anandamide metabolism." *Biochem Pharmacol* **50**(5): 677-86.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Brussow, K. P. y col. (2006). "Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complexes on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir." *J Reprod Dev* **52**(2): 249-57.
- Bureau, M. y col. (2002). "Binding regulation of porcine spermatozoa to oviductal vesicles in vitro." *J Androl* **23**(2): 188-93.

- Cacciola, G. y col. (2008a). "Expression of type-1 cannabinoid receptor during rat postnatal testicular development: possible involvement in adult leydig cell differentiation." *Biol Reprod* **79**(4): 758-65.
- Cacciola, G. y col. (2008b). "The endocannabinoid system in vertebrate male reproduction: a comparative overview." *Mol Cell Endocrinol* **286**(1-2 Suppl 1): S24-30.
- Cadas, H. y col. (1997). "Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain." *J Neurosci* **17**(4): 1226-42.
- Carrasco, L. C. y col. (2008a). "Glycosidase determination in bovine oviducal fluid at the follicular and luteal phases of the oestrous cycle." *Reprod Fertil Dev* **20**(7): 808-17.
- Carrasco, L. C. y col. (2008b). "Determination of glycosidase activity in porcine oviductal fluid at the different phases of the estrous cycle." *Reproduction* **136**(6): 833-42.
- Catanzaro, G. y col. (2011). "Effect of capacitation on the endocannabinoid system of mouse sperm." *Mol Cell Endocrinol* **343**(1-2): 88-92.
- Caterina, M. J. y col. (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." *Nature* **389**(6653): 816-24.
- Cella, M. y col. (2008). "Dual effect of anandamide on rat placenta nitric oxide synthesis." *Placenta* **29**(8): 699-707.
- Cobellis, G. y col. (2006). "Endocannabinoid system in frog and rodent testis: type-1 cannabinoid receptor and fatty acid amide hydrolase activity in male germ cells." *Biol Reprod* **75**(1): 82-9.
- Cohen-Dayag, A. y col. (1995). "Sperm capacitation in humans is transient and correlates with chemotactic responsiveness to follicular factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(24): 11039-43.
- Console-Bram, L. y col. (2012). "Cannabinoid receptors: nomenclature and pharmacological principles." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **38**(1): 4-15.
- Coy, P. y col. (2012). "Roles of the oviduct in mammalian fertilization." *Reproduction*.
- Crane, L. H. y L. Martin (1991). "Postcopulatory myometrial activity in the rat as seen by video-laparoscopy." *Reprod Fertil Dev* **3**(6): 685-98.
- Cravatt, B. F. y col. (2001). "Supersensitivity to anandamide and enhanced endogenous cannabinoid signaling in mice lacking fatty acid amide hydrolase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9371-6.
- Cravatt, B. F. y col. (1996). "Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides." *Nature* **384**(6604): 83-7.
- Cravatt, B. F. y col. (2004). "Functional disassociation of the central and peripheral fatty acid amide signaling systems." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(29): 10821-6.
- Cross, N. L. (1998). "Role of cholesterol in sperm capacitation." *Biol Reprod* **59**(1): 7-11.
- Chang, H. y S. S. Suarez (2012). "Unexpected flagellar movement patterns and epithelial binding behavior of mouse sperm in the oviduct." *Biol Reprod* **86**(5): 140, 1-8.
- Chang, M. C. (1951). "Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes." *Nature* **168**(4277): 697-8.
- Childers, S. R. y col. (1994). "Effects of anandamide on cannabinoid receptors in rat brain membranes." *Biochem Pharmacol* **47**(4): 711-5.
- Chuang, H. H. y col. (2001). "Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition." *Nature* **411**(6840): 957-62.
- Daigle, T. L. y col. (2008). "Regulation of CB1 cannabinoid receptor internalization by a promiscuous phosphorylation-dependent mechanism." *J Neurochem* **106**(1): 70-82.
- De Petrocellis, L. y col. (2001a). "Palmitoylethanolamide enhances anandamide stimulation of human vanilloid VR1 receptors." *FEBS Lett* **506**(3): 253-6.
- De Petrocellis, L. y col. (2001b). "The vanilloid receptor (VR1)-mediated effects of anandamide are potently enhanced by the cAMP-dependent protein kinase." *J Neurochem* **77**(6): 1660-3.
- DeMott, R. P. y col. (1995). "Carbohydrates mediate the adherence of hamster sperm to oviductal epithelium." *Biol Reprod* **52**(6): 1395-403.



- Demuth, D. G. y A. Molleman (2006). "Cannabinoid signalling." *Life Sci* **78**(6): 549-63.
- Devane, W. A. y col. (1988). "Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain." *Mol Pharmacol* **34**(5): 605-13.
- Devane, W. A. y col. (1992). "Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor." *Science* **258**(5090): 1946-9.
- Di Marzo, V. y col. (2001). "Anandamide: some like it hot." *Trends Pharmacol Sci* **22**(7): 346-9.
- Di Marzo, V. y col. (1994). "Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons." *Nature* **372**(6507): 686-91.
- Di Pasquale, E. y col. (2009). "The insertion and transport of anandamide in synthetic lipid membranes are both cholesterol-dependent." *PLoS One* **4**(3): e4989.
- Dickens, C. J. y col. (1995). "Human tubal fluid: formation and composition during vascular perfusion of the fallopian tube." *Hum Reprod* **10**(3): 505-8.
- Dobrinski, I. y col. (1996a). "Role of carbohydrates in the attachment of equine spermatozoa to uterine tubal (oviductal) epithelial cells in vitro." *Am J Vet Res* **57**(11): 1635-9.
- Dobrinski, I. y col. (1997). "Membrane contact with oviductal epithelium modulates the intracellular calcium concentration of equine spermatozoa in vitro." *Biol Reprod* **56**(4): 861-9.
- Dobrinski, I. y col. (1996b). "Intracellular calcium concentration in equine spermatozoa attached to oviductal epithelial cells in vitro." *Biol Reprod* **54**(4): 783-8.
- Downey, B. R. (1980). "Regulation of the estrous cycle in domestic animals-- a review." *Can Vet J* **21**(11): 301-6.
- Eddy (2006). *The Spermatozoon. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. J. D. Neill. St. Louis, Elsevier academic press. **1**: 3-54.
- Ehrenwald, E. y col. (1990). "Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux." *Mol Reprod Dev* **25**(2): 195-204.
- Ekhlasi-Hundrieser, M. y col. (2005). "Spermadhesin AQN1 is a candidate receptor molecule involved in the formation of the oviductal sperm reservoir in the pig." *Biol Reprod* **73**(3): 536-45.
- El-Talatini, M. R. y col. (2009a). "Localisation and function of the endocannabinoid system in the human ovary." *PLoS One* **4**(2): e4579.
- El-Talatini, M. R. y col. (2009b). "Fluctuation in anandamide levels from ovulation to early pregnancy in in-vitro fertilization-embryo transfer women, and its hormonal regulation." *Hum Reprod* **24**(8): 1989-98.
- El-Talatini, M. R. y col. (2010). "The relationship between plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, sex steroids, and gonadotrophins during the menstrual cycle." *Fertil Steril* **93**(6): 1989-96.
- Ellington, J. E. y col. (1993). "In vitro interaction between oviduct epithelial and equine sperm." *Arch Androl* **31**(2): 79-86.
- Ellington, J. E. y col. (1998). "Human sperm function in co-culture with human, macaque or bovine oviduct epithelial cell monolayers." *Hum Reprod* **13**(10): 2797-804.
- Evans, R. M. y col. (2007). "Chronic exposure of sensory neurones to increased levels of nerve growth factor modulates CB1/TRPV1 receptor crosstalk." *Br J Pharmacol* **152**(3): 404-13.
- Fazeli, A. y col. (2004). "Sperm-induced modification of the oviductal gene expression profile after natural insemination in mice." *Biol Reprod* **71**(1): 60-5.
- Fazeli, A. y col. (1999). "Sperm-oviduct interaction: induction of capacitation and preferential binding of uncapacitated spermatozoa to oviductal epithelial cells in porcine species." *Biol Reprod* **60**(4): 879-86.
- Fazeli, A. y col. (2003). "In vitro maintenance of boar sperm viability by a soluble fraction obtained from oviductal apical plasma membrane preparations." *Reproduction* **125**(4): 509-17.

- Feigelson, M. y E. Kay (1972). "Protein patterns of rabbit oviducal fluid." *Biol Reprod* **6**(2): 244-52.
- Fezza, F. y col. (2008). "Fatty acid amide hydrolase: a gate-keeper of the endocannabinoid system." *Subcell Biochem* **49**: 101-32.
- Florman, H. a. D., T. (2006). Fertilization in Mammals. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. J. D. Neill. St. Louis, Elsevier academic press. **1**: 55-112.
- Florman, H. M. y col. (1998). "A perspective on the control of mammalian fertilization by egg-activated ion channels in sperm: a tale of two channels." *Biol Reprod* **59**(1): 12-6.
- Fonseca, B. M. y col. (2009). "Spatio-temporal expression patterns of anandamide-binding receptors in rat implantation sites: evidence for a role of the endocannabinoid system during the period of placental development." *Reprod Biol Endocrinol* **7**: 121.
- Fonseca, B. M. y col. (2010). "N-acylethanolamine levels and expression of their metabolizing enzymes during pregnancy." *Endocrinology* **151**(8): 3965-74.
- Francavilla, F. y col. (2009). "Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability." *Endocrinology* **150**(10): 4692-700.
- Fu, J. y col. (2011). "A catalytically silent FAAH-1 variant drives anandamide transport in neurons." *Nat Neurosci* **15**(1): 64-9.
- Gadella, B. M. y col. (2008). "Sperm head membrane reorganisation during capacitation." *Int J Dev Biol* **52**(5-6): 473-80.
- Gainetdinov, R. R. y col. (2004). "Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions." *Annu Rev Neurosci* **27**: 107-44.
- Gebeh, A. K. y col. (2012). "Ectopic pregnancy is associated with high anandamide levels and aberrant expression of FAAH and CB1 in fallopian tubes." *J Clin Endocrinol Metab* **97**(8): 2827-35.
- Georgiou, A. S. y col. (2005). "Gametes alter the oviductal secretory proteome." *Mol Cell Proteomics* **4**(11): 1785-96.
- Gervasi, M. G. y S. Perez Martinez (2007). Participación de la anandamida en la interacción espermatozoide-oviducto en bovinos. *Facultad de Cs. Exactas y Naturales*. Buenos Aires, Universidad de Buenos Aires (UBA). **Tesis de Licenciatura en Cs. Biológicas**: 1-71.
- Gervasi, M. G. y col. (2009). "The endocannabinoid system in bull sperm and bovine oviductal epithelium: role of anandamide in sperm-oviduct interaction." *Reproduction* **137**(3): 403-14.
- Giuffrida, A. y col. (2000). "Quantification of bioactive acylethanolamides in rat plasma by electrospray mass spectrometry." *Anal Biochem* **280**(1): 87-93.
- Glass, M. y C. C. Felder (1997). "Concurrent stimulation of cannabinoid CB1 and dopamine D2 receptors augments cAMP accumulation in striatal neurons: evidence for a Gs linkage to the CB1 receptor." *J Neurosci* **17**(14): 5327-33.
- Grimaldi, P. y col. (2009). "The endocannabinoid system and pivotal role of the CB2 receptor in mouse spermatogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(27): 11131-6.
- Grippo, A. A. y col. (1994). "Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct." *J Reprod Fertil* **102**(1): 87-93.
- Grippo, A. A. y col. (1992). "Cation concentrations in fluid from the oviduct ampulla and isthmus of cows during the estrous cycle." *J Dairy Sci* **75**(1): 58-65.
- Gualtieri, R. y col. (2005). "Intracellular calcium and protein tyrosine phosphorylation during the release of bovine sperm adhering to the fallopian tube epithelium in vitro." *Reproduction* **129**(1): 51-60.
- Gualtieri, R. y col. (2012). "Bovine oviductal monolayers cultured under three-dimension conditions secrete factors able to release spermatozoa adhering to the tubal reservoir in vitro." *Theriogenology*.
- Gualtieri, R. y R. Talevi (2000). "In vitro-cultured bovine oviductal cells bind acrosome-intact sperm and retain this ability upon sperm release." *Biol Reprod* **62**(6): 1754-62.

- Gunthorpe, M. J. y col. (2002). "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." *Trends Pharmacol Sci* **23**(4): 183-91.
- Guo, Y. y col. (2005). "N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D is an important determinant of uterine anandamide levels during implantation." *J Biol Chem* **280**(25): 23429-32.
- Gurevich, V. V. y E. V. Gurevich (2006). "The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors." *Pharmacol Ther* **110**(3): 465-502.
- Gwathmey, T. M. y col. (2006). "Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct." *Biol Reprod* **75**(4): 501-7.
- Gwathmey, T. M. y col. (2003). "PDC-109 (BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir." *Biol Reprod* **69**(3): 809-15.
- Gye, M. C. y col. (2005). "Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes." *Arch Androl* **51**(3): 247-55.
- Habayeb, O. M. y col. (2004). "Plasma levels of the endocannabinoid anandamide in women-a potential role in pregnancy maintenance and labor?" *J Clin Endocrinol Metab* **89**(11): 5482-7.
- Hallett, M. y col. (1972). "Tetracycline fluorescence as calcium-probe for nerve membrane with some model studies using erythrocyte ghosts." *J Membr Biol* **10**(1): 31-44.
- Hansen, C. y col. (1991). "Presence of follicular fluid in the porcine oviduct and its contribution to the acrosome reaction." *Mol Reprod Dev* **30**(2): 148-53.
- Harper, C. V. y col. (2004). "Stimulation of human spermatozoa with progesterone gradients to simulate approach to the oocyte. Induction of  $[Ca^{2+}]_i$  oscillations and cyclical transitions in flagellar beating." *J Biol Chem* **279**(44): 46315-25.
- Harper, M. J. (1973). "Relationship between sperm transport and penetration of eggs in the rabbit oviduct." *Biol Reprod* **8**(4): 441-50.
- Harrison, R. A. y col. (1996). "Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes." *Mol Reprod Dev* **45**(3): 378-91.
- Hermann, H. y col. (2003). "Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response." *Cell Mol Life Sci* **60**(3): 607-16.
- Hillard, C. J. y A. Jarrahian (2003). "Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy." *Br J Pharmacol* **140**(5): 802-8.
- Ho, B. Y. y col. (1999). "Coupling of the expressed cannabinoid CB1 and CB2 receptors to phospholipase C and G protein-coupled inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels." *Receptors Channels* **6**(5): 363-74.
- Holt, W. V. (2011). "Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison." *Reprod Domest Anim* **46** Suppl 2: 68-74.
- Holt, W. V. y A. Fazeli (2010). "The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection." *Mol Reprod Dev* **77**(11): 934-43.
- Holt, W. V. y R. E. Lloyd (2010). "Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well?" *Theriogenology* **73**(6): 713-22.
- Hook, S. J. y E. S. Hafez (1968). "A comparative anatomical study of the mammalian uterotubal junction." *J Morphol* **125**(2): 159-84.
- Horne, A. W. y col. (2008). "CB1 expression is attenuated in Fallopian tube and decidua of women with ectopic pregnancy." *PLoS One* **3**(12): e3969.
- Hung, P. H. y S. S. Suarez (2012). "Alterations to the bull sperm surface proteins that bind sperm to oviductal epithelium." *Biol Reprod* **87**(4): 88.
- Hunter, R. H. (1981). "Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation." *J Reprod Fertil* **63**(1): 109-17.
- Hunter, R. H. (2008). "Sperm release from oviduct epithelial binding is controlled hormonally by peri-ovulatory graafian follicles." *Mol Reprod Dev* **75**(1): 167-74.

- Hunter, R. H. (2012). "Components of oviduct physiology in eutherian mammals." *Biol Rev Camb Philos Soc* **87**(1): 244-55.
- Hunter, R. H. y col. (1991). "Distribution, morphology and epithelial interactions of bovine spermatozoa in the oviduct before and after ovulation: a scanning electron microscope study." *Tissue Cell* **23**(5): 641-56.
- Hunter, R. H. y R. Nichol (1983). "Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus." *J Exp Zool* **228**(1): 121-8.
- Hunter, R. H. y I. Wilmut (1984). "Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct." *Reprod Nutr Dev* **24**(5A): 597-608.
- Ignatz, G. G. y col. (2007). "Annexins are candidate oviductal receptors for bovine sperm surface proteins and thus may serve to hold bovine sperm in the oviductal reservoir." *Biol Reprod* **77**(6): 906-13.
- Ireland, J. J. y col. (1980). "Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum." *J Dairy Sci* **63**(1): 155-60.
- Ito, T. y col. (2011). "Progesterone is a sperm-releasing factor from the sperm-storage tubules in birds." *Endocrinology* **152**(10): 3952-62.
- Jaiswall, B. y M. Eisenbach (2002). Capacitation. *Fertilization*. D. Hardy y D. Garbers, Elsevier: 57-117.
- Jarrahian, A. y col. (2004). "D2 dopamine receptors modulate G $\alpha$ -subunit coupling of the CB1 cannabinoid receptor." *J Pharmacol Exp Ther* **308**(3): 880-6.
- Jimenez-Gonzalez, C. y col. (2006). "Calcium signalling in human spermatozoa: a specialized 'toolkit' of channels, transporters and stores." *Hum Reprod Update* **12**(3): 253-67.
- Jonsson, K. O. y col. (2001). "Effects of homologues and analogues of palmitoylethanolamide upon the inactivation of the endocannabinoid anandamide." *Br J Pharmacol* **133**(8): 1263-75.
- Jordt, S. E. y D. Julius (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." *Cell* **108**(3): 421-30.
- Karasu, T. y col. (2011). "The role of sex steroid hormones, cytokines and the endocannabinoid system in female fertility." *Hum Reprod Update* **17**(3): 347-61.
- Kathuria, S. y col. (2003). "Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis." *Nat Med* **9**(1): 76-81.
- Killian, G. (2011). "Physiology and endocrinology symposium: evidence that oviduct secretions influence sperm function: a retrospective view for livestock." *J Anim Sci* **89**(5): 1315-22.
- Klinger, F. G. y col. (2006). "Stage-variations of anandamide hydrolase activity in the mouse uterus during the natural oestrus cycle." *J Exp Clin Assist Reprod* **3**: 3.
- Kodithuwakku, S. P. y col. (2007). "Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells." *Reproduction* **133**(6): 1087-94.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lam, P. M. y col. (2008). "Ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the measurement of anandamide in human plasma." *Anal Biochem* **380**(2): 195-201.
- Lam, P. M. y col. (2010). "Simultaneous measurement of three N-acyl ethanolamides in human bio-matrices using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Anal Bioanal Chem* **398**(5): 2089-97.
- Lambert, D. M. y V. Di Marzo (1999). "The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic?" *Curr Med Chem* **6**(8): 757-73.
- Lambert, D. M. y col. (2002). "The palmitoylethanolamide family: a new class of anti-inflammatory agents?" *Curr Med Chem* **9**(6): 663-74.
- Lapointe, J. y J. F. Bilodeau (2003). "Antioxidant defenses are modulated in the cow oviduct during the estrous cycle." *Biol Reprod* **68**(4): 1157-64.



- Lassarguere, J. y col. (2003). "Time- and dose-related effects of estradiol and diethylstilbestrol on the morphology and function of the fetal rat testis in culture." *Toxicol Sci* **73**(1): 160-9.
- Lazzarin, N. y col. (2004). "Fluctuations of fatty acid amide hydrolase and anandamide levels during the human ovulatory cycle." *Gynecol Endocrinol* **18**(4): 212-8.
- Lee, C. N. y R. L. Ax (1984). "Concentrations and composition of glycosaminoglycans in the female bovine reproductive tract." *J Dairy Sci* **67**(9): 2006-9.
- Leese, H. J. (1988). "The formation and function of oviduct fluid." *J Reprod Fertil* **82**(2): 843-56.
- Lefebvre, R. y S. S. Suarez (1996). "Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium." *Biol Reprod* **54**(3): 575-82.
- Levallet, J. y S. Carreau (1997). "[In vitro gene expression of aromatase in rat testicular cells]." *C R Acad Sci III* **320**(2): 123-9.
- Lichtman, A. H. y col. (2004). "Reversible inhibitors of fatty acid amide hydrolase that promote analgesia: evidence for an unprecedented combination of potency and selectivity." *J Pharmacol Exp Ther* **311**(2): 441-8.
- Liu, J. y col. (2006). "A biosynthetic pathway for anandamide." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(36): 13345-50.
- Losel, R. y M. Wehling (2003). "Nongenomic actions of steroid hormones." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(1): 46-56.
- Luconi, M. y col. (2004). "Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens." *Steroids* **69**(8-9): 553-9.
- Lui, C. W. y S. Meizel (1979). "Further evidence in support of a role for hamster sperm hydrolytic enzymes in the acrosome reaction." *J Exp Zool* **207**(2): 173-85.
- Lloyd, R. E. y col. (2008). "Temporal dynamics of ram sperm binding and survival during 48-h coculture with oviducal epithelial cells." *Reprod Fertil Dev* **20**(7): 835-45.
- Lloyd, R. E. y col. (2009). "Effects of oviductal proteins, including heat shock 70 kDa protein 8, on survival of ram spermatozoa over 48 h in vitro." *Reprod Fertil Dev* **21**(3): 408-18.
- Maccarrone, M. y col. (2005). "Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction." *J Cell Sci* **118**(Pt 19): 4393-404.
- Maccarrone, M. y col. (2002a). "Estrogen stimulates arachidonylethanolamide release from human endothelial cells and platelet activation." *Blood* **100**(12): 4040-8.
- Maccarrone, M. y col. (2003a). "Progesterone activates fatty acid amide hydrolase (FAAH) promoter in human T lymphocytes through the transcription factor Ikaros. Evidence for a synergistic effect of leptin." *J Biol Chem* **278**(35): 32726-32.
- Maccarrone, M. y col. (2002b). "Low fatty acid amide hydrolase and high anandamide levels are associated with failure to achieve an ongoing pregnancy after IVF and embryo transfer." *Mol Hum Reprod* **8**(2): 188-95.
- Maccarrone, M. y col. (2003b). "Anandamide activity and degradation are regulated by early postnatal aging and follicle-stimulating hormone in mouse Sertoli cells." *Endocrinology* **144**(1): 20-8.
- Maccarrone, M. y col. (2010). "Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling." *Trends Biochem Sci* **35**(11): 601-8.
- Maccarrone, M. y col. (2000a). "Down-regulation of anandamide hydrolase in mouse uterus by sex hormones." *Eur J Biochem* **267**(10): 2991-7.
- Maccarrone, M. y col. (2003c). "Leptin activates the anandamide hydrolase promoter in human T lymphocytes through STAT3." *J Biol Chem* **278**(15): 13318-24.
- Maccarrone, M. y col. (2000b). "Relation between decreased anandamide hydrolase concentrations in human lymphocytes and miscarriage." *Lancet* **355**(9212): 1326-9.

- Maccarrone, M. y col. (2001). "Progesterone up-regulates anandamide hydrolase in human lymphocytes: role of cytokines and implications for fertility." *J Immunol* **166**(12): 7183-9.
- Marczylo, T. H. y col. (2009). "A solid-phase method for the extraction and measurement of anandamide from multiple human biomatrices." *Anal Biochem* **384**(1): 106-13.
- Martin, B. R. y col. (2004). "Signaling pathways involved in the development of cannabinoid tolerance." *Trends Pharmacol Sci* **25**(6): 325-30.
- Mastroianni, L., Jr. y col. (1970). "Protein patterns in monkey oviductal fluid before and after ovulation." *Fertil Steril* **21**(12): 817-20.
- Matias, I. y col. (2007). "Role and regulation of acylethanolamides in energy balance: focus on adipocytes and beta-cells." *Br J Pharmacol* **152**(5): 676-90.
- Matsuda, L. A. y col. (1990). "Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA." *Nature* **346**(6284): 561-4.
- McAllister, S. D. y M. Glass (2002). "CB(1) and CB(2) receptor-mediated signalling: a focus on endocannabinoids." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **66**(2-3): 161-71.
- McFarland, M. J. y E. L. Barker (2004). "Anandamide transport." *Pharmacol Ther* **104**(2): 117-35.
- Miller, J. G. y G. A. Schultz (1987). "Amino acid content of preimplantation rabbit embryos and fluids of the reproductive tract." *Biol Reprod* **36**(1): 125-9.
- Mondejar, I. y col. (2012). "The oviduct: functional genomic and proteomic approach." *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 3**: 22-9.
- Muccioli, G. G. y col. (2010). "The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis." *Mol Syst Biol* **6**: 392.
- Mullins, K. J. y R. G. Saacke (1989). "Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport." *Anat Rec* **225**(2): 106-17.
- Munro, S. y col. (1993). "Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids." *Nature* **365**(6441): 61-5.
- Murray, S. C. y T. T. Smith (1997). "Sperm interaction with fallopian tube apical membrane enhances sperm motility and delays capacitation." *Fertil Steril* **68**(2): 351-7.
- Nallendran, V. y col. (2010). "The plasma levels of the endocannabinoid, anandamide, increase with the induction of labour." *BJOG* **117**(7): 863-9.
- Naz, R. K. y R. Sellamuthu (2006). "Receptors in spermatozoa: are they real?" *J Androl* **27**(5): 627-36.
- O'Neil, R. G. y R. C. Brown (2003). "The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: molecular integrators of microenvironmental stimuli." *News Physiol Sci* **18**: 226-31.
- Oda, S. y col. (2006). "Differential expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in the bovine oviduct." *J Endocrinol* **191**(1): 263-74.
- Oddi, S. y col. (2009). "Molecular identification of albumin and Hsp70 as cytosolic anandamide-binding proteins." *Chem Biol* **16**(6): 624-32.
- Okamoto, Y. y col. (2004). "Molecular characterization of a phospholipase D generating anandamide and its congeners." *J Biol Chem* **279**(7): 5298-305.
- Osycka-Salut, C. y col. (2012). "Anandamide induces sperm release from oviductal epithelia through nitric oxide pathway in bovines." *PLoS One* **7**(2): e30671.
- Pacher, P. y col. (2006). "The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy." *Pharmacol Rev* **58**(3): 389-462.
- Pagotto, U. y col. (2006). "The emerging role of the endocannabinoid system in endocrine regulation and energy balance." *Endocr Rev* **27**(1): 73-100.
- Paria, B. C. y col. (1995). "The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9460-4.

- Paria, B. C. y col. (1996). "The uterus is a potential site for anandamide synthesis and hydrolysis: differential profiles of anandamide synthase and hydrolase activities in the mouse uterus during the periimplantation period." *Mol Reprod Dev* **45**(2): 183-92.
- Parrish, J. J. y col. (1988). "Capacitation of bovine sperm by heparin." *Biol Reprod* **38**(5): 1171-80.
- Parrish, J. J. y col. (1989). "Capacitation of bovine sperm by heparin: inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH." *Biol Reprod* **41**(4): 683-99.
- Pentikainen, V. y col. (2000). "Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(5): 2057-67.
- Pertwee, R. G. y col. (2010). "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2)." *Pharmacol Rev* **62**(4): 588-631.
- Petersen, G. y H. S. Hansen (1999). "N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolysing phospholipase D lacks the ability to transphosphatidylate." *FEBS Lett* **455**(1-2): 41-4.
- Petrunkina, A. M. y col. (2001). "Kinetic characterization of the changes in protein tyrosine phosphorylation of membranes, cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and viability in boar sperm populations selected by binding to oviductal epithelial cells." *Reproduction* **122**(3): 469-80.
- Pintado, B. y col. (2000). "Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability." *J Reprod Fertil* **118**(1): 145-52.
- Pinto, J. C. y col. (1994). "Cannabinoid receptor binding and agonist activity of amides and esters of arachidonic acid." *Mol Pharmacol* **46**(3): 516-22.
- Piomelli, D. (2001). "The ligand that came from within." *Trends Pharmacol Sci* **22**(1): 17-9.
- Pollard, J. W. y col. (1991). "Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding of oviductal epithelial cells." *Biol Reprod* **44**(1): 102-7.
- Premkumar, L. S. y G. P. Ahern (2000). "Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C." *Nature* **408**(6815): 985-90.
- Puffenbarger, R. A. (2005). "Molecular biology of the enzymes that degrade endocannabinoids." *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* **4**(6): 625-31.
- Rahe, C. H. y col. (1980). "Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: dependence upon the period of the cycle." *Endocrinology* **107**(2): 498-503.
- Revah, I. y col. (2000). "Physiological state of bull sperm affects fucose- and mannose-binding properties." *Biol Reprod* **62**(4): 1010-5.
- Ribeiro, M. L. y col. (2009). "17beta-oestradiol and progesterone regulate anandamide synthesis in the rat uterus." *Reprod Biomed Online* **18**(2): 209-18.
- Ricci, G. y col. (2007). "Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus." *Gen Comp Endocrinol* **153**(1-3): 320-2.
- Roberts, S. (1986). *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases* 3rd Ed. Stephen Roberts, Woodstock, VT. (1986). Woodstock, VT.
- Rodriguez-Martinez, H. (2007). "Role of the oviduct in sperm capacitation." *Theriogenology* **68 Suppl 1**: S138-46.
- Ross, R. A. (2003). "Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors." *Br J Pharmacol* **140**(5): 790-801.
- Rossato, M. y col. (2005). "Human sperm express cannabinoid receptor Cb1, the activation of which inhibits motility, acrosome reaction, and mitochondrial function." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 984-91.
- Rossi, G. y col. (2007). "Follicle-stimulating hormone activates fatty acid amide hydrolase by protein kinase A and aromatase-dependent pathways in mouse primary Sertoli cells." *Endocrinology* **148**(3): 1431-9.
- Roth, S. H. y P. J. Williams (1979). "The non-specific membrane binding properties of delta9-tetrahydrocannabinol and the effects of various solubilizers." *J Pharm Pharmacol* **31**(4): 224-30.

- Schuel, H. (2006). "Tuning the oviduct to the anandamide tone." *J Clin Invest* **116**(8): 2087-90.
- Schuel, H. y L. J. Burkman (2005). "A tale of two cells: endocannabinoid-signaling regulates functions of neurons and sperm." *Biol Reprod* **73**(6): 1078-86.
- Schuel, H. y col. (2002a). "N-Acylethanolamines in human reproductive fluids." *Chem Phys Lipids* **121**(1-2): 211-27.
- Schuel, H. y col. (2002b). "Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization." *Mol Reprod Dev* **63**(3): 376-87.
- Simon, G. M. y B. F. Cravatt (2006). "Endocannabinoid biosynthesis proceeding through glycerophospho-N-acyl ethanolamine and a role for alpha/beta-hydrolase 4 in this pathway." *J Biol Chem* **281**(36): 26465-72.
- Song, C. Y. y col. (2010). "Spatial and temporal expression of spermadhesin genes in reproductive tracts of male and female pigs and ejaculated sperm." *Theriogenology* **73**(5): 551-9.
- Sordelli, M. S. y col. (2011). "The effect of anandamide on uterine nitric oxide synthase activity depends on the presence of the blastocyst." *PLoS One* **6**(4): e18368.
- Sparling, P. B. y col. (2003). "Exercise activates the endocannabinoid system." *Neuroreport* **14**(17): 2209-11.
- Stadel, R. y col. (2011). "The cannabinoid type-1 receptor carboxyl-terminus, more than just a tail." *J Neurochem* **117**(1): 1-18.
- Stanke, D. F. y col. (1974). "Proteins and amino acids in bovine oviducal fluid." *J Reprod Fertil* **38**(2): 493-6.
- Strunker, T. y col. (2011). "The CatSper channel mediates progesterone-induced Ca<sup>2+</sup> influx in human sperm." *Nature* **471**(7338): 382-6.
- Suarez, S. y col. (1991). "Attachment of boar sperm to mucosal explants of oviduct in vitro: possible role in formation of a sperm reservoir." *Biol Reprod* **44**(6): 998-1004.
- Suarez, S. S. (2002). "Formation of a reservoir of sperm in the oviduct." *Reprod Domest Anim* **37**(3): 140-3.
- Suarez, S. S. (2008). "Regulation of sperm storage and movement in the mammalian oviduct." *Int J Dev Biol* **52**(5-6): 455-62.
- Suarez, S. S. y A. A. Pacey (2006). "Sperm transport in the female reproductive tract." *Hum Reprod Update* **12**(1): 23-37.
- Suarez, S. S. y col. (1998). "Bull sperm binding to oviductal epithelium is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent lectin on sperm that recognizes Lewis-a trisaccharide." *Biol Reprod* **59**(1): 39-44.
- Sugiura, T. y col. (1996). "Enzymatic synthesis of anandamide, an endogenous cannabinoid receptor ligand, through N-acylphosphatidylethanolamine pathway in testis: involvement of Ca(2+)-dependent transacylase and phosphodiesterase activities." *Biochem Biophys Res Commun* **218**(1): 113-7.
- Sun, X. y S. K. Dey (2008). "Aspects of endocannabinoid signaling in periimplantation biology." *Mol Cell Endocrinol* **286**(1-2 Suppl 1): S3-11.
- Sun, X. y col. (2009). "Genetic loss of Faah compromises male fertility in mice." *Biol Reprod* **80**(2): 235-42.
- Sun, X. y col. (2010). "Endocannabinoid signaling directs differentiation of trophoblast cell lineages and placentation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(39): 16887-92.
- Sun, Y. X. y col. (2004). "Biosynthesis of anandamide and N-palmitoylethanolamine by sequential actions of phospholipase A2 and lysophospholipase D." *Biochem J* **380**(Pt 3): 749-56.
- Talevi, R. y R. Gualtieri (2001). "Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro." *Biol Reprod* **64**(2): 491-8.
- Talevi, R. y R. Gualtieri (2010). "Molecules involved in sperm-oviduct adhesion and release." *Theriogenology* **73**(6): 796-801.



- Talevi, R. y col. (2007). "Redox regulation of sperm surface thiols modulates adhesion to the fallopian tube epithelium." *Biol Reprod* **76**(4): 728-35.
- Tapia, J. A. y col. (2012). "The membrane of the mammalian spermatozoa: much more than an inert envelope." *Reprod Domest Anim* **47 Suppl 3**: 65-75.
- Tay, J. I. y col. (1997). "Human tubal fluid: production, nutrient composition and response to adrenergic agents." *Hum Reprod* **12**(11): 2451-6.
- Taylor, A. H. y col. (2010). "Endocannabinoids and pregnancy." *Clin Chim Acta* **411**(13-14): 921-30.
- Taylor, A. H. y col. (2007). "The role of the endocannabinoid system in gametogenesis, implantation and early pregnancy." *Hum Reprod Update* **13**(5): 501-13.
- Taylor, A. H. y col. (2011). "Modulation of the endocannabinoid system in viable and non-viable first trimester pregnancies by pregnancy-related hormones." *Reprod Biol Endocrinol* **9**: 152.
- Thomas, P. G. y col. (1994). "A subpopulation of morphologically normal, motile spermatozoa attach to equine oviductal epithelial cell monolayers." *Biol Reprod* **51**(2): 303-9.
- Trabucco, E. y col. (2009). "Endocannabinoid system in first trimester placenta: low FAAH and high CB1 expression characterize spontaneous miscarriage." *Placenta* **30**(6): 516-22.
- Travis, A. J. y G. S. Kopf (2002). "The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa." *J Clin Invest* **110**(6): 731-6.
- Tsumura, M. y col. (2012). "TRPV1-mediated calcium signal couples with cannabinoid receptors and sodium-calcium exchangers in rat odontoblasts." *Cell Calcium* **52**(2): 124-36.
- Ueda, N. y col. (2010). "N-acyl ethanolamine metabolism with special reference to N-acyl ethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA)." *Prog Lipid Res* **49**(4): 299-315.
- Ueda, N. y col. (1995). "Oxygenation of arachidonyl ethanolamide (anandamide) by lipoxygenases." *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* **23**: 163-5.
- Ueda, N. y col. (2001). "Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance." *J Biol Chem* **276**(38): 35552-7.
- Vadnais, M. L. y col. (2007). "Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation." *Arch Androl* **53**(3): 109-23.
- Vellani, V. y col. (2001). "Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide." *J Physiol* **534**(Pt 3): 813-25.
- Villalón M, G. M., Carreño D y Pérez Martínez S (2010). Physiological and pharmacological aspects in the oviductal function in mammals. *Inflammatory Mediators Involved in Normal and Pathological Pregnancies*. R. M. a. F. MG. Kerala, Research Signpost: 1-30.
- Visconti, P. E. (2009). "Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(3): 667-8.
- Visconti, P. E. y col. (1995a). "Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation." *Development* **121**(4): 1129-37.
- Visconti, P. E. y col. (1995b). "Capacitation of mouse spermatozoa. II. Protein tyrosine phosphorylation and capacitation are regulated by a cAMP-dependent pathway." *Development* **121**(4): 1139-50.
- Wang, H. y col. (2006a). "Jekyll and hyde: two faces of cannabinoid signaling in male and female fertility." *Endocr Rev* **27**(5): 427-48.
- Wang, H. y col. (2004). "Aberrant cannabinoid signaling impairs oviductal transport of embryos." *Nat Med* **10**(10): 1074-80.
- Wang, H. y col. (2006b). "Endocannabinoid signaling directs periimplantation events." *AAPS J* **8**(2): E425-32.
- Wang, H. y col. (2006c). "Fatty acid amide hydrolase deficiency limits early pregnancy events." *J Clin Invest* **116**(8): 2122-31.

- Wang, H. y col. (2007). "Differential regulation of endocannabinoid synthesis and degradation in the uterus during embryo implantation." Prostaglandins Other Lipid Mediat **83**(1-2): 62-74.
- Wei, B. Q. y col. (2006). "A second fatty acid amide hydrolase with variable distribution among placental mammals." J Biol Chem **281**(48): 36569-78.
- Wijayagunawardane, M. P. y col. (1998). "Local distributions of oviductal estradiol, progesterone, prostaglandins, oxytocin and endothelin-1 in the cyclic cow." Theriogenology **49**(3): 607-18.
- Yanagimachi, R. (1994). Mammalian fertilization. The Physiology of Reproduction. E. Knobil yJ. D. Neill. New York, Raven Press. **1**: 189-317.
- Yanagimachi, R. (2009). "Germ cell research: a personal perspective." Biol Reprod **80**(2): 204-18.
- Yanagimachi, R. (2012). "Fertilization studies and assisted fertilization in mammals: their development and future." J Reprod Dev **58**(1): 25-32.
- Yang, J. y col. (1994). "Progesterone and RU486: opposing effects on human sperm." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(2): 529-33.
- Yaniz, J. L. y col. (2000). "Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa." Anat Rec **260**(3): 268-78.
- Yates, M. L. y E. L. Barker (2009). "Organized trafficking of anandamide and related lipids." Vitam Horm **81**: 25-53.
- Yeste, M. y col. (2009). "Direct contact between boar spermatozoa and porcine oviductal epithelial cell (OEC) cultures is needed for optimal sperm survival in vitro." Anim Reprod Sci **113**(1-4): 263-78.
- Yu, M. y col. (1997). "Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2." J Biol Chem **272**(34): 21181-6.
- Zoerner, A. A. y col. (2009). "Targeted stable-isotope dilution GC-MS/MS analysis of the endocannabinoid anandamide and other fatty acid ethanol amides in human plasma." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **877**(26): 2909-23.
- Zygmunt, P. M. y col. (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature **400**(6743): 452-7.

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. El ciclo estral bovino .....	1
2. El oviducto de mamíferos.....	2
2.1. Anatomía del oviducto de mamíferos.....	2
2.2. Fluidooviductal.....	5
2.3. Función oviductal .....	6
3. El espermatozoide de mamíferos .....	7
3.1. Morfología y función espermática.....	7
3.2. Adquisición de la capacidad fecundante.....	9
3.2.1. La capacitación espermática.....	9
3.2.2. Pasaje por el tracto reproductor de la hembra. ....	12
4. El reservorio oviductal.....	15
4.1. Moléculas que intervienen en la formación del reservorio oviductal.....	16
4.2. Interacción espermatozoide-oviducto.....	17
4.2.1. Influencia de los espermatozoides sobre el oviducto .....	17
4.2.2. Regulación de la función espermática por parte del oviducto .....	18
4.3. Liberación de los espermatozoides del reservorio oviductal.....	19
5. El sistema endocannabinoide.....	21
5.1. Endocannabinoides .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
5.2. Metabolismo de endocannabinoides.....	23
5.2.1. Síntesis de AEA .....	23
5.2.2. Transporte de AEA .....	25
5.2.3. Degradación de AEA.....	25
5.3.Receptores .....	27
5.3.1. Receptores de cannabinoides (CBs).....	27
5.3.2. Receptores de vanilloides TRPVs .....	29
5.4. El sistema endocannabinoide en reproducción.....	31
5.4.1. El sistema endocannabinoide en el tracto reproductor.....	31
5.4.2. Participación de la AEA en eventos reproductivos .....	33
5.4.3. Interacción entre el sistema endocannabinoide y las hormonas ováricas.....	36

5.4.4. El sistema endocannabinoide como regulador de la interacción espermatozoide-oviducto en bovinos.....	37
---	----

## **Hipótesis y objetivos.....39**

## **Materiales y métodos.....40**

1. Drogas, Medios y Material Biológico.....	40
1.2. Soluciones y medios.....	41
1.3. Material biológico.....	43
1.3.1. Oviductos bovinos .....	43
1.3.2. Semen bovino criopreservado.....	43
1.3.3. Procesamiento del material biológico .....	43
1.3.4. Clasificación de los oviductos .....	44
2. Cultivos primarios de CEO bovinas .....	44
3. Medición de NAEs .....	44
3.1. Recolección de las muestras.....	44
3.2. Extracción de NAEs.....	45
3.3. Determinación de NAEs.....	46
4. RT-PCR .....	46
4.1. Extracción de ARN.....	46
4.2. Preparado de ADNc.....	46
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	47
4.4. Detección de la amplificación.....	47
5. Western blot .....	48
5.1. Procesamiento de las muestras.....	48
5.2. Separación electroforética de las muestras.....	48
5.3. Electrotransferencia de proteínas.....	48
5.4. Inmunodetección y revelado.....	49
5.5. Identificación de las bandas proteicas.....	49

6. Inmunocitoquímica .....	50
6.1. Fijación de las muestras.....	50
6.2. Inmunodetección .....	50
6.2.1. En preparados de espermatozoides.....	50
6.2.2. En preparados de CEO.....	51
6.2.3. En cortes de oviducto bovino .....	51
7. Actividad de la enzima hidrolasa de amidas de ácidos grasos (FAAH) .....	52
8. Co-cultivos.....	52
8.1. Diseño experimental para el estudio de la participación de las hormonas ováricas y los endocannabinoides en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino.....	54
8.1.1. Hormonas ováricas.....	54
8.1.2. Endocannabinoides .....	54
8.2. Diseño experimental para el estudio de la participación del $Ca^{2+}$ en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal bovino .....	55
9. Determinación del calcio intracelular ( $Ca^{2+}_i$ ) .....	56
10. Capacitación espermática .....	57
10.1. Evaluación de la capacitación por CTC.....	57
10.2. Inducción de la reacción acrosomal con LPC.....	58
10.3. Fosforilación en residuos tirosina.....	59
11. Análisis de la función espermática.....	60
11.1. Motilidad.....	60
11.2. Viabilidad.....	60
11.3. Integridad del acrosoma.....	61
11.4. Estado de capacitación.....	61
12. Análisis estadístico de los datos.....	61
<b>Resultados.....</b>	<b>63</b>

1. Estudio de los niveles de endocannabinoides en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.....	63
1.1. Medida de los niveles de NAEs en el fluido oviductal bovino a lo largo del ciclo estral.....	63
1.2. Medida de los niveles de NAEs en células epiteliales del oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.....	65
1.3. Expresión y localización de la enzima NAPE-PLD en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.....	68
1.4. Expresión y localización de la enzima FAAH en el oviducto bovino a lo largo del ciclo estral.....	73
1.5. Medida de la actividad de la enzima FAAH en CEO bovinas a lo largo del ciclo estral.....	77
1.6. Medida de los niveles de AEA en el fluido folicular bovino.....	77
2. Estudio de la interacción de las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal.....	78
2.1. Efecto de las hormonas ováricas en la liberación de los espermatozoides de las CEO.....	78
2.2. Interacción entre las hormonas ováricas y el sistema endocannabinoide en la liberación de los espermatozoides de las CEO.....	79
2.2.1. Participación de los receptores CB1 en el mecanismo de acción de las hormonas ováricas.....	79
2.2.2. Participación de los receptores TRPV1 en el mecanismo de acción de las hormonas ováricas. ..	80
2.3. Estudio de la expresión de las enzimas NAPE-PLD y FAAH en espermatozoides y CEO.....	82
2.4. Estudio de la regulación del sistema endocannabinoide por las hormonas ováricas en CEO y espermatozoides.....	85
2.4.1. Expresión de los mensajeros de FAAH y NAPE-PLD en CEO en cultivo.....	85
2.4.2. Producción de AEA en CEO y espermatozoides .....	86
3. Estudio del mecanismo de acción de la AEA en el proceso de liberación de los espermatozoides del epitelio oviductal en bovinos.....	87
3.1. Estudio de la interacción entre los receptores CB1 y TRPV1 en la liberación de los espermatozoides de las CEO.....	87
3.2. Efecto de la inhibición de FAAH en la liberación de los espermatozoides de las CEO.....	90
3.3. Evaluación del $\text{Ca}^{2+}$ como parte del mecanismo de acción de AEA en la liberación de los espermatozoides de las CEO.....	91
3.4. Participación de la AEA en la capacitación espermática en bovinos.....	97
3.5. Estudio de las posibles vías de activación de AEA en la capacitación espermática en bovinos....	100
3.6. Caracterización de la población de espermatozoides liberados de las CEO.....	102
<b>Discusión.....</b>	<b>104</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>121</b>

<b>Referencias.....</b>	<b>123</b>
-------------------------	------------